

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

d'

ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

François Seydoux

Thèse : "Spécificité cinétique et étapes réactionnelles de la catalyse trypsique"

Soutenue le 1969 devant la Commission d'Examen.

M. J. TONNELAT Président

Mlle J. YON

M. de GENNES

M. J. LAVOREL.

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

d'

ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

François Seydoux

Thèse : "Spécificité cinétique et étapes réactionnelles de la catalyse trypsique"

Soutenue le devant la Commission d'Examen.

M. J. TONNELAT Président

Mlle J. YON

M. de GENNES

M. J. LAVOREL.



A mon père



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552201_0028

Ce travail a été effectué au Laboratoire d'Enzymologie Physico-chimique et Moléculaire de la Faculté des Sciences d'Orsay.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. TONNELAT, dont l'enseignement nous a initié aux problèmes de la biologie physico-chimique, d'avoir bien voulu présider le Jury de cette Thèse ; qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur DE GENNES et Monsieur J. LAVOREL, Directeur de Recherches au C. N. R. S., d'avoir bien voulu faire partie du Jury de cette Thèse.

Ce travail n'a pu se développer que grâce aux encouragements et aux conseils que Mademoiselle J. YON, Directeur de Recherches au C. N. R. S., nous a constamment prodigués ; nous lui exprimons notre profonde reconnaissance et nous tenons également à rendre hommage ici à son dynamisme et à sa conception élevée de la recherche scientifique qui nous ont été d'un grand secours tout au long de ce travail.

Nous remercions également Monsieur J.J. BECHET qui nous a initié, à notre entrée au Laboratoire, aux problèmes cinétiques, ainsi que tous nos camarades du Laboratoire pour les échanges que nous avons pu avoir et l'atmosphère détendue qu'ils y font régner. Ce travail a bénéficié de la collaboration de Messieurs COUTOULY, LACROUX, BURET et DEVAUX, au cours de stages effectués au Laboratoire ; nous les en remercions bien vivement. Enfin, la réalisation matérielle de ce texte n'a été possible que grâce à la compétence de Mesdames J. LAVOREL et D. LE MEUR, que nous remercions bien vivement.

P R E M I E R E P A R T I E

Interprétations de l'efficacité et de la spécificité de la catalyse enzymatique.

PREMIERE PARTIE - INTERPRETATIONS DE L'EFFICACITE ET DE LA SPECIFICITE DE LA

CATALYSE ENZYMATIQUE.

La catalyse enzymatique est caractérisée par sa grande efficacité et sa haute spécificité. Son efficacité rend possible des transformations chimiques au sein des organismes dans des conditions de température et de pH compatibles avec la fragilité des édifices moléculaires des êtres vivants.

Le phénomène vivant étant essentiellement constitué d'une suite de transformations chimiques complexes, on conçoit que les enzymes y jouent un rôle fondamental.

LES "MODELES ENZYMATIQUES".

L'efficacité de la catalyse enzymatique s'évalue en la comparant à la catalyse organique ordinaire.

La notion de "modèle enzymatique" s'est considérablement développée ces dernières années et a permis une évaluation quantitative de l'efficacité de l'action enzymatique par rapport à celle de la catalyse organique dans des réactions simples ^a. De fait, la comparaison d'une réaction enzymatique à des modèles n'est possible que lorsque l'aspect chimique de la transformation mise en jeu a été détaillé sur le plan du mécanisme : il n'y a aucune raison pour que les mécanismes établis en chimie organique physique ne puissent être utilisés par l'enzyme dans son action, et c'est donc là le point de départ de toute tentative d'interprétation de la catalyse enzymatique. Ceci suppose donc de commencer avec des enzymes catalysant des réactions simples bien étudiées sur le plan chimique et c'est ce qui explique que la plupart des travaux explicatifs aient été entrepris avec des enzymes protéolytiques doués d'une activité estérasique ou amidasique et agissant sur des substrats synthétiques de structure simple.

Par ailleurs, l'étude des modèles en eux-mêmes a été stimulée par celle de l'action enzymatique, sans doute à cause de son caractère spectaculaire qui n'a pas laissé indifférents les spécialistes de la chimie organique physique. De cet intérêt grandissant des physico-chimistes organiciens pour l'enzymologie a résulté une prolifération de travaux originaux ^b et une progression importante de l'interprétation théorique de l'efficacité de la catalyse enzymatique en termes de modèles: la plupart des concepts utilisés en enzymologie physicochimique proviennent

a - L'ouvrage de T.C. BRUCE et S.J. BENKOVIC "Bioorganic Mechanisms" 1966 (W.A. BENJAMIN New York) est tout à fait révélateur de cette évolution.

b - On peut souligner ici l'importance des travaux explicatifs effectués par Bender et col. dans le cas des enzymes protéolytiques (ref. 1).

d'observations effectuées sur des modèles de catalyse organique.

Cependant, il est évident que la catalyse enzymatique ne peut pas être entièrement expliquée par des modèles, la complexité des structures protéiques, leur fragilité et leurs propriétés structurales en sont la preuve directe; ramener l'action enzymatique à celle de modèles revient à la considérer comme localisée au centre actif, ce qui s'est révélé inexact dans de nombreux cas.

Dans cette première partie nous discuterons les principaux concepts utilisés pour rendre compte de l'efficacité de la catalyse enzymatique et nous essaierons de montrer comment ils permettent ou non d'interpréter la spécificité qui comprend en fait deux parties distinctes :

- La spécificité dans le type de fonction chimique transformée
- La spécificité en relation avec la structure du substrat, indépendamment du type de la transformation chimique.

C'est d'ailleurs essentiellement au niveau de cette seconde spécificité que l'action enzymatique se différencie des modèles. Par exemple, exception faite des effets électroniques et stériques, la catalyse basique d'hydrolyse des esters dépend assez peu de l'environnement chimique de la liaison hydrolysée, alors que l'action enzymatique en dépend énormément comme nous le verrons par la suite tout au long de ce travail.

Les facteurs électroniques et stériques qui servent en général à expliquer les différences de réactivité dans l'action catalytique de modèles sur une série de substrats ne sont plus suffisants lorsqu'il s'agit d'interpréter l'acte enzymatique.

D'une façon générale il est important lorsqu'on cherche à étudier la spécificité d'un enzyme de bien séparer les variations de réactivité d'un substrat à l'autre en termes de réactivité intrinsèque, c'est à dire sa réactivité telle qu'elle peut être mesurée dans des processus catalytiques modèles (catalyse basique par ex) et en termes d'effets proprement enzymatiques, dont essentiellement la spécificité.

Par exemple, dans le cas de la chymotrypsine, Bender (1) a proposé pour des substrats du type $R_1\text{-CONH-CH}(R_2)\text{ COX}$ (dérivés de L'acides aminés N acylés) la relation :

$$\log k_{\text{cat}}/K_m = \log k_{\text{cat}}^0/K_m^0 + \rho^* \sigma_x^* + S_{R_1} + S_{R_2} \quad \text{Eq. (1).}$$

dans laquelle k_{cat} est la vitesse maximum, K_m la constante de Michaelis apparente, l'indice 0 correspond au substrat pris comme référence arbitraire, ρ^* est la constante de Taft caractéristique du type de réaction mis en jeu et voisine de 2 ($1-\sigma_x^*$ la constante polaire du substituant x et S_{R_1} , S_{R_2} deux facteurs de spécificité des substituants R_1 et R_2).

On sépare ainsi la réactivité apparente du substrat en 3 termes indépendants, un terme de réactivité non enzymatique évaluable à partir des facteurs stériques et électroniques ^a et deux termes de spécificité enzymatique provenant de l'interaction de l'enzyme avec les substituants R_1 et R_2 .

Il est évident qu'une approche systématique de la spécificité enzymatique doit être entreprise à partir de telles relations (J.J. Béchet, communication personnelle).

CONCEPTS PHYSICOCHIMIQUES ESSENTIELS A L'INTERPRETATION DE L'EFFICACITE ET DE LA SPECIFICITE DE L'ACTION ENZYMATIQUE.

On peut pour expliquer la spécificité et l'efficacité de la catalyse enzymatique se placer à deux points de vue différents : soit en supposant l'enzyme comme une entité rigide, soit au contraire en admettant que sa flexibilité peut jouer un rôle important dans la catalyse.

Le premier point de vue est évidemment le plus simple car tout se ramène alors à étudier les interactions du substrat avec le centre actif rigide de l'enzyme puis à envisager comment ces interactions peuvent permettre la transformation chimique du substrat : pour cela, il est nécessaire d'utiliser un certain nombre de concepts physicochimiques provenant le plus souvent de l'analyse de la réactivité des molécules organiques. Nous allons d'abord énumérer et discuter ces concepts sur la base d'un enzyme rigide, puis nous prendrons en considération le rôle de la conformation de l'enzyme dans la catalyse.

a) FACTEURS DE PROXIMITE

La catalyse enzymatique s'effectue généralement au sein de complexes non covalents enzyme-substrats ES. L'enzyme assure donc le rapprochement des réactifs, permettant ainsi une catalyse *intramoléculaire*. Si une réaction donnée implique le rapprochement d'un ou des substrats et de plusieurs entités catalytiques, il est évident que la catalyse *intramoléculaire* sera beaucoup plus efficace qu'une catalyse *intermoléculaire* qui nécessitera des collisions multiples peu probables, même en solution (4).

Koshland (5) a analysé la contribution des effets de proximité à l'efficacité de la catalyse enzymatique. Il apparaît que ces effets sont relativement faibles dans la mesure où la concentration en centre actif d'une solution d'enzyme est beaucoup plus petite que celle que l'on peut atteindre avec les réactifs habituels, ce qui atténue considérablement l'importance des effets de proximité.

a - Le facteur stérique n'est pas pris en considération dans la relation 1 (2).

Quoiqu'il en soit , la comparaison de la catalyse enzymatique à un modèle de catalyse intramoléculaire permet d'éliminer *a priori* ces effets de proximité, or l'efficacité de la catalyse enzymatique est en général très supérieure à celle de tels modèles et de plus, les effets de proximité ne permettent pas d'expliquer la spécificité enzymatique.

b) EFFETS DE SOLVANT ET DE MICROENVIRONNEMENT.

On sait que les réactions organiques sont très sensibles aux effets de solvants: ^a.

Comme par ailleurs les enzymes présentent souvent au niveau de leur centre actif des polarités extrêmement faibles (dues à un environnement hydrophobe), on peut concevoir que cette diminution de la polarité par rapport au milieu aqueux favorise la catalyse surtout si le complexe activé présente un caractère ionique *plus* prononcé que les réactifs de départ.

D'autre part, la proximité d'un groupement ionisé ou d'un fort dipole peut accentuer la polarisation de la liaison labile du substrat et en faciliter la rupture. Il est à remarquer que l'effet d'un tel groupe sera d'autant plus important que la polarité de son environnement sera faible (relation avec les effets de solvant). A ce sens, dans le cas de la chymotrypsine, on a pu mettre en évidence des zones polaires (7) et apolaires (8) voisines au niveau du centre actif de l'enzyme ; il est possible qu'elles aient conjointement un rôle dans la catalyse.

Mais comme pour les effets de proximité il semble difficile d'expliquer la spécificité par de tels facteurs : en effet pour des substrats différents, l'environnement du centre actif doit rester constant, sauf bien entendu si le substrat contribue lui même à cet environnement en modifiant la conformation du centre actif, mais il ne s'agit plus alors d'un enzyme rigide.

c) CATALYSE ACIDE BASE - INTERMEDIAIRES COVALENTS.

La catalyse acide base est sans doute un facteur important de l'efficacité de la catalyse enzymatique . Beaucoup d'enzymes présentent des profils activité-pH en cloche ou sigmoïde pouvant révéler l'existence d'une catalyse acide ou basique, mais également une dénaturation alcaline ou acide réversible.

Dans le cas de nombreux enzymes protéolytiques l'imidazole impliqué au centre actif assiste l'attaque nucléophile de la sérine sur le carbonyle du substrat suivant un processus de catalyse générale basique (schéma a de la figure 1). Dans le cas du lysozyme , 2 carboxyles catalyseraient l'hydrolyse de la liaison glycosidique suivant un processus de catalyse générale acide pour le carboxyle protoné du résidu glutamyl 35. Le rôle du second carboxyle du résidu aspartyl 52 agissant

a - voir par exemple ref. 6.

sous sa forme déprotonée est plus hypothétique, il pourrait par exemple stabiliser l'ion carbonium formé(9) (effet de microenvironnement) (schéma b fig. 1).

Par ailleurs, on a pu mettre en évidence la formation intermédiaire d'un acylenzyme ou d'autres types de complexes covalents pour de nombreux enzymes ^a suivant le schéma classique :



dans lequel ES et ES' sont respectivement les complexes de Michaelis et l'intermédiaire covalent, E l'enzyme libre, S le substrat et P₁, P₂ les deux produits de la réaction. K_S est la constante de dissociation du complexe de Michaelis et les constantes k₂ et k₃ correspondent aux étapes d'acylation et de désacylation dans le cas où ES' est un acyl enzyme.

La formation de tels intermédiaires relativement stables mais très réactifs permet le fractionnement et donc l'abaissement de la barrière énergétique d'activation : l'acte catalytique s'effectue suivant deux étapes (acylation et désacylation) au lieu d'une seule étape qui nécessitent chacune une énergie d'activation inférieure à celle requise par un processus sans intermédiaire covalent.

Mais là encore aucune spécificité de l'enzyme ne peut être expliquée dans la mesure où de tels complexes doivent être formés indépendamment de la spécificité du substrat.

d) EFFETS D'ORIENTATION DU SUBSTRAT.

L'orientation du substrat au sein du complexe ES par rapport aux entités catalytiques est certainement un facteur très important de la catalyse enzymatique.

L'enzyme doit pouvoir sélectionner une conformation précise du substrat parmi un très grand nombre de conformations possibles : *à ce niveau, il est possible d'introduire la notion de spécificité.*

Il est évident que pour que la catalyse s'effectue, il faut que la liaison modifiable du substrat soit correctement orientée par rapport aux entités catalytiques. Un exemple particulièrement frappant de l'importance de l'orientation réciproque du substrat et des entités catalytiques est donné par la modification chimique de la subtilisine en thiosubtilisine, (transformation de la sérine du centre actif en cystéine) réalisée indépendamment par Koshland (11) et Bender (12). La cystéine obtenue est théoriquement aussi réactive que la sérine vis à vis des

a - Voir les références données dans la revue générale de Koshland (ref. 10; p.372) dont nous nous sommes largement inspiré dans ce travail.

Schéma a : attaque nucléophile de la sérine sur le carbonyle du substrat assistée par l'imidazole suivant un processus de catalyse générale basique (cas de nombreuses protéases).

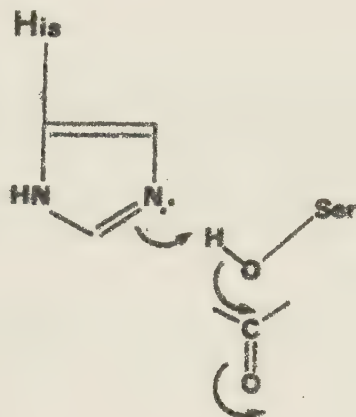
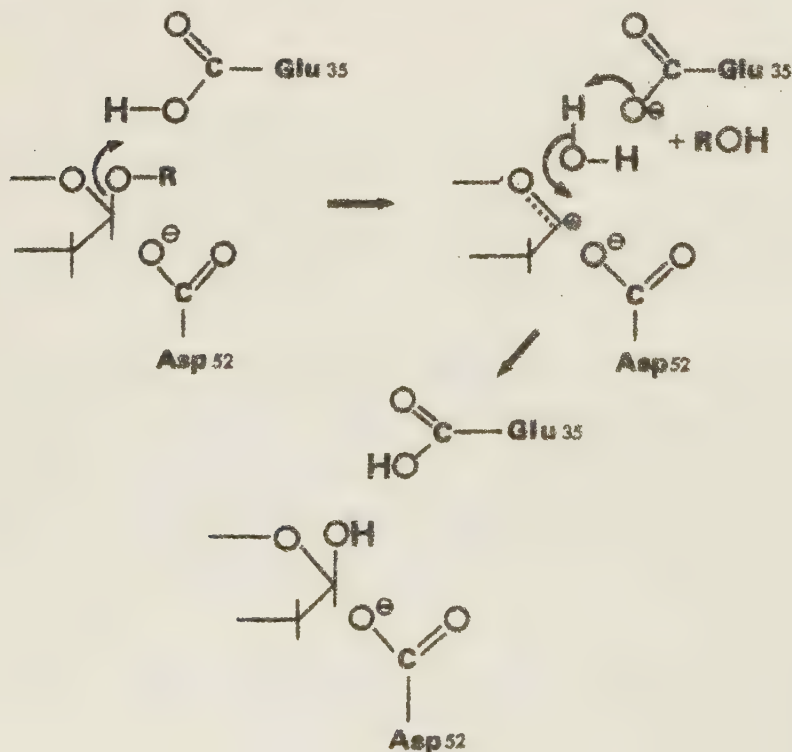


Figure 1 - Exemples de catalyse générale acide et basique dans les réactions enzymatiques.

Schéma b : Catalyse de l'hydrolyse d'une liaison β glycosidique par le lysozyme suivant un processus de catalyse générale acide (et basique au niveau du carbocation formé) impliquant le carboxyle du glutamyl 35.



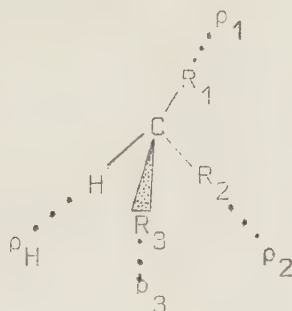
esters substrats de cet enzyme, or la thiosubtilisine est très peu active vis à vis des mêmes composés ^a.

On peut expliquer ce résultat en considérant que le rayon de Van der Waals du soufre est supérieur à celui de l'oxygène et que la légère modification de la géométrie du complexe ES qui en découle gêne considérablement l'acte catalytique. Ceci illustre bien l'extrême précision requise dans la disposition relative des entités catalytiques et du substrat au sein de ES pour que la transformation chimique s'effectue.

Les effets d'orientation du substrat fournissent un élément d'explication de la spécificité de la catalyse enzymatique. Nous allons donc résumer maintenant les principaux travaux effectués dans ce domaine et qui expliquent la spécificité enzymatique en terme d'orientation du substrat au sein des complexes intermédiaires tout en supposant l'enzyme rigide.

Niemann a étudié de façon systématique la spécificité de la chymotrypsine vis à vis de substrats synthétiques au niveau de la formation du complexe de Michaelis et de son évolution ultérieure (étape d'acylation).

Le modèle qu'il propose met en jeu l'interaction du substrat noté $R_1R_2R_3CH$ (dérivés de N acyl L aminoacides) avec 4 loci de l'enzyme notés ρ_1, ρ_2, ρ_3 et ρ_H suivant le schéma (13) :



avec $R_1 = NHCOR'_1$, $R_2 =$ chaîne latérale de l'acide amino et $R_3 = COR'_3$, qui est le groupement hydrolysé par l'enzyme.

Le schéma précédent est suffisant pour interpréter quantitativement les valeurs de K_S constante de dissociation du complexe d'adsorption enzyme-substrat ($=K_m$ dans ce cas) d'une série d'amides d'acides aminés D et L N acylés (14). Mais l'excellent accord obtenu entre la théorie et l'expérience n'est peut être pas aussi concluant qu'il apparaît dans la mesure où l'on dispose de 4 paramètres arbitraires pour ajuster les valeurs théoriques de K_S aux valeurs expérimentales, l'énergie

^a - La diminution de la réactivité de la thiosubtilisine est moins importante dans le cas des substrats aspécifiques ce qui peut s'expliquer si l'orientation de ces derniers au sein du complexe ES est moins précise que celle des substrats spécifiques.

globale ΔG d'interaction du substrat avec l'enzyme pouvant s'écrire dans le cas du schéma précédent.

$$\Delta G = \Delta G_{11} + \Delta G_{22} + \Delta G_{33} + \Delta G_{HH} \quad \text{Eq. (2)}$$

Chaque terme ΔG_{11} , etc... correspondant à l'interaction d'un locus de l'enzyme avec la partie correspondante du substrat. On peut également définir des enthalpies libres d'interaction ΔG_{ij} avec $j \neq i$ qui correspondent à une mauvaise orientation du substrat par rapport à l'enzyme ^a. (interaction du locus 1 avec R_2 par exemple etc...).

Il apparaît donc que dans le cas de la chymotrypsine l'enthalpie libre d'interaction ES dans le complexe de Michaelis peut être interprétée *sur la base d'un enzyme rigide*.

Un autre résultat important obtenu par Niemann et col. est l'existence de complexes ES non productifs (14,15) : c'est à dire incapables d'évoluer ultérieurement et dans lesquels le substrat se trouve dans une conformation impropre à la catalyse mais favorable sur le plan énergétique ($\Delta G_{ij} < 0$ avec $i \neq j$).

Sur la base du schéma de Michaelis à un seul intermédiaire ES ^b, le schéma cinétique qui décrit cette situation s'écrit :

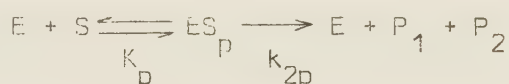
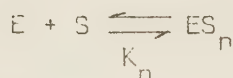


schéma cinétique 2



et la vitesse d'apparition des produits P_1 et P_2 à l'état stationnaire est donnée par la relation :

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{dP_2}{dt} = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{K_m}{S}} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\text{avec } k_{cat} = \frac{\sum_p k_{2p} \bar{K}_p}{\sum_p \bar{K}_p + \sum_n \bar{K}_n} \quad \text{Eq. (4) et } 1/K_m = \sum_p \bar{K}_p + \sum_n \bar{K}_n \quad \text{Eq. (5)}$$

a - Les termes de "mauvaise orientation" se rapportent ici à la catalyse et non à la fixation du substrat sur l'enzyme.

b - Ce schéma est suffisant pour décrire le cas de l'hydrolyse chymotrypsique d'amides pour lesquelles l'étape d'acylation est limitante (1) ($k_2 \ll k_3$ dans le schéma cinétique 1).

les $\bar{K}_p$ et les $\bar{K}_n$ étant respectivement les inverses des constantes de dissociation, K_p et K_n des complexes productifs ES_p et des complexes improductifs ES_n .

Ainsi un substrat peut se fixer sur l'enzyme avec une très bonne affinité (K_m faible) mais par suite de la prédominance de complexes non productifs

($\sum \bar{K}_n > \sum \bar{K}_p$) son évolution ultérieure sera beaucoup plus lente que celle d'un substrat uniquement fixé dans des modes productifs puisque :

$$\frac{\sum \bar{K}_p k_{2p}}{\sum \bar{K}_n + \sum \bar{K}_p} \ll (k_{2p})_{\max} \text{ si } \sum \bar{K}_n \gg \sum \bar{K}_p \quad \text{Eq. (6)}$$

$$\text{avec } (k_{2p})_{\max} = \frac{\sum \bar{K}_p k_{2p}}{\sum \bar{K}_p} \quad \text{Eq. (7)}$$

Il n'y a plus alors de correlations possibles entre K_m et k_{cat} et le seul critère de spécificité est donné par la valeur du rapport :

$$k_{\text{cat}} / K_m = \frac{\sum \bar{K}_p k_{2p}}{\sum \bar{K}_p}$$

dans laquelle seuls apparaissent les modes productifs. (1).

Il est évident que la spécificité de l'action enzymatique ne peut être uniquement interprétée à partir de tels effets dans la mesure où ils ne peuvent expliquer les énormes variations observées sur le rapport k_{cat} / K_m lorsqu'on passe d'un substrat spécifique à un substrat non spécifique, mais il n'en reste pas moins que sur la base du schéma précédent, les variations des paramètres k_{cat} et K_m d'un substrat à l'autre ne peuvent dans certains cas constituer un critère de spécificité^a, surtout lorsqu'on compare des substrats ayant une potentialité d'interactions avec l'enzyme identique (isomères optiques D et L par exemple).

A partir de l'hypothèse des 4 loci de l'enzyme, Niemann et col. (14) ont pu évaluer les facteurs $\sum \bar{K}_p$ et $\sum \bar{K}_n$, puis en déduire des valeurs de $(k_{2p})_{\max}$ pour différentes amides spécifiques de la chymotrypsine.

Les valeurs ainsi obtenues ne varient que d'un facteur 2 pour 5 acyltyrosinamides différentes, alors que les k_{cat} observés varient entre eux d'un facteur 10 au maximum. Comme les réactivités intrinsèques de ces amides sont sensiblement identiques et doivent être reflétées par des valeurs de $(k_{2p})_{\max}$, ce résultat consti-

a- surtout dans le cas de K_m , par opposition au mécanisme de la clé et de la serrure proposé à la fin du siècle dernier par Fischer (17).

tue un argument en faveur de fixations non productives.

Il semble que de telles fixations soient assez générales puisqu'elles ont été proposées dans le cas d'autres enzymes comme la papaïne (18), le lysozyme (19) et une β amylase (20).

Les considérations de Niemann sur l'orientation du substrat par rapport à l'enzyme ne s'appliquent qu'à la formation du complexe de Michaelis et qu'à son évolution ultérieure (étape d'acylation sur la base du schéma cinétique 1).

Bender (21) a envisagé la possibilité d'effets d'orientation au niveau de l'acylenzyme pouvant expliquer la spécificité de la chymotrypsine au cours de l'étape de désacylation (k_3); l'enthalpie d'activation $\Delta H^\ddagger$ déterminée à partir de k_3 est sensiblement constante pour des substrats de spécificité variable, alors que l'entropie d'activation $\Delta S^\ddagger$ croît fortement en valeur absolue lorsqu'on passe d'un substrat spécifique à un substrat non spécifique ^a.

Cette spécificité de l'enzyme s'exerçant uniquement au niveau de l'entropie d'activation peut être due à un blocage du substrat spécifique dans une conformation réactive par des groupes de contact de l'enzyme. Ce blocage n'est plus obtenu avec les substrats aspécifiques par suite de l'absence de leur structure des substituants spécifiques et ainsi l'entropie d'activation se trouve augmentée en valeur absolue.

Une conclusion analogue a été donnée par Knowles (22) en analysant la stéréospécificité de la chymotrypsine au niveau de l'étape de désacylation (k_3). Cet auteur montre en effet qu'il existe une corrélation linéaire de pente négative entre $\log k_3$ (L) et $\log k_3$ (D), les k_3 (L ou D) étant les constantes de désacylation des formes L et D d' α N acetyl aminoacides paranitrophenylesters normalisées afin d'éliminer le facteur correspondant à la réactivité intrinsèque du substrat ^b. Plus un substrat L est hydrolysé rapidement et plus sa forme D correspondante est résistante à l'hydrolyse enzymatique : on assiste donc à une véritable inversion de la spécificité de l'enzyme lorsqu'on passe de la forme L à la Forme D. Par exemple l'acetyl L Tryptophane paranitrophenyl ester est hydrolysé 23 fois plus rapidement que le dérivé de la L leucine correspondant, par contre l'isomère D de ce dernier est hydrolysé près de 6 fois plus rapidement que l'acetyl D Tryptophane paranitrophenyl ester. Ces résultats sont interprétables sur la base d'une orientation impropre des formes D par rapport aux formes L au niveau du centre actif

a - $\Delta H^\ddagger = 10.3 \pm 1$ Kcal, $\Delta S^\ddagger = -13.4 \pm 5$ ue. pour l'N acetyl tyrosylchymotrypsine, $k_3 = 3540$ à 25° en valeur relative. $\Delta H^\ddagger = 9.7 \pm 1$ Kcal et $\Delta S^\ddagger = -35.9 \pm 5$ ue.

pour l'acetyl chymotrypsine avec $k_3 = 1$ en valeur relative.

b - La normalisation de k_3 est effectuée en divisant sa valeur expérimentale par celle d'un substrat de référence (acetyl glycine paranitrophenyl ester) et en multipliant cette quantité par le rapport des vitesses d'hydrolyse alcaline des dérivés carbobenzoxy correspondants.

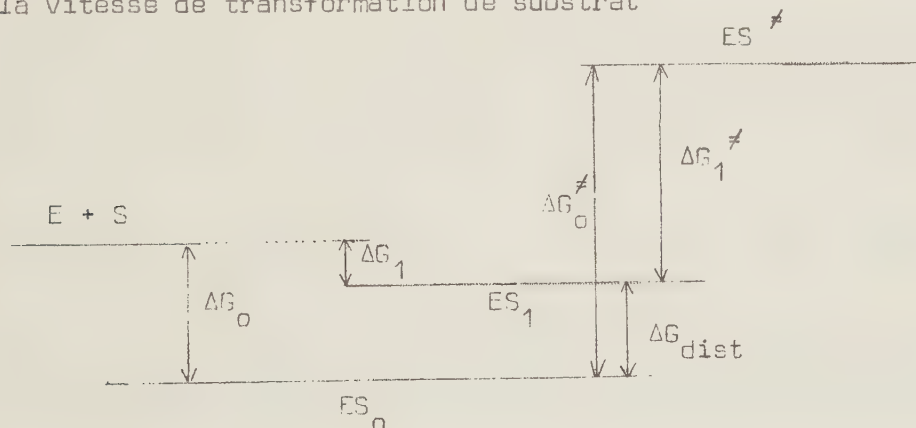
de l'acylenzyme ^a.

e) DISTORSION DU SUBSTRAT DANS LE COMPLEXE ES ("RACK" ou STRAIN).

Eyring et Lumry (23,24) ont été conduits à introduire un concept qui semble important pour interpréter la spécificité et l'efficacité de la catalyse enzymatique (25) : il s'agit de la théorie du "rack" ou du "strain" dans laquelle le substrat se fixerait sur l'enzyme dans un état contraint où la liaison labile serait fortement distordue et donc dans un état de prédissociation. Un tel mécanisme permettrait d'abaisser considérablement la barrière de transition étant donné que l'état du substrat dans le complexe de Michaelis se rapprocherait de son état dans le complexe activé.

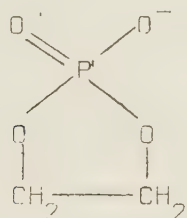
Evidemment, cette distorsion du substrat ne peut se faire qu'au détriment d'une partie de l'enthalpie libre d'interaction enzyme-substrat.

Par exemple, comme l'indique le schéma ci-contre, si une partie de l'enthalpie libre d'interaction enzyme-substrat ΔG_0 au sein d'un hypothétique complexe ES_0 sert à amener le substrat dans un état contraint ES_1 où la liaison à rompre est labilisée, l'enthalpie libre d'interaction ΔG_0 sera diminuée d'une quantité ΔG_{dist} , $\Delta G_{dist} = \Delta G_0 - \Delta G_1$, ΔG_1 étant l'enthalpie libre d'interaction enzyme-substrat mesurée en réalité et ΔG_{dist} l'enthalpie libre requise pour placer le substrat dans cet état contraint à partir du complexe ES_0 , mais par ailleurs l'enthalpie libre d'activation $\Delta G_1^\ddagger$ sera diminuée du même facteur ΔG_{dist} , d'où une accélération de la vitesse de transformation de substrat

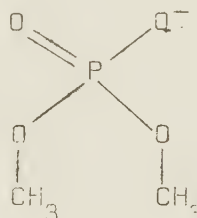


a - On ne peut plus parler ici de complexes improductifs puisqu'il s'agit d'un complexe covalent.

Des exemples modèles montrant l'intérêt de tels processus dans l'accélération des réactions organiques abondent dans la littérature. On peut citer par exemple l'hydrolyse alcaline de l'éthylène phosphate (I) et du diméthylphosphate (II) : l'hydrolyse du premier s'effectue 10^8 fois plus rapidement que celle du second (26) par suite de la contrainte imposée à la liaison P-O par la structure cyclique de l'éthylène phosphate.



I



II

Dans le cas des réactions enzymatiques, il est fréquent que l'accroissement de la potentialité d'interactions du substrat avec l'enzyme ^a se traduise plutôt par une augmentation du k_{cat} que par une diminution du K_m : ceci est justement expliqué par le schéma précédent ; un exemple significatif de ce type d'effet est donné par Hofstee dans le cas d'estérases comme la chymotrypsine (27,28, 29) : l'hydrolyse d'esters d'acides gras est accélérée lorsque la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'acide croît, mais cette accélération se traduit par une augmentation importante de k_{cat} plutôt que par une diminution du K_m .

D'une façon générale l'idée d'une distorsion du substrat au sein du complexe ES implique que la spécificité de l'enzyme s'exerce plus sur les étapes catalytiques (spécificité cinétique) que sur les étapes d'adsorption (spécificité de fixation) et doit être rapprochée de l'interprétation des effets d'orientation.

ROLE DE LA CONFORMATION DE L'ENZYME DANS LA CATALYSE.

Comme nous l'avons déjà indiqué au début de ce texte, l'application de ces concepts physicochimiques à la catalyse enzymatique suppose qu'elle est localisée au niveau d'un centre actif rigide, ce qui est faire bien peu de cas de l'extraordinaire souplesse des édifices protéiques.

On s'est donc demandé depuis longtemps quel pouvait être le rôle de la

a - par exemple en augmentant la taille du substrat et donc le nombre de groupes susceptibles d'interagir avec l'enzyme.

conformation de l'enzyme dans la catalyse enzymatique ? On peut se contenter de dire que l'ensemble de la molécule protéique forme un tout et que la conformation rigide du centre actif permettant une orientation précise de ses groupements fonctionnels essentiels est maintenue par le reste de la molécule : si on dénature la protéine enzyme celle-ci perd simultanément son activité .

Mais comment expliquer complètement alors la spécificité de l'action enzymatique à partir d'un centre actif rigide de dimensions limitées ? Si par exemple un facteur 10^7 ^a différencie les substrats les plus spécifiques des moins spécifiques, les effets d'orientation impliqueraient de façon schématique que l'enzyme soit capable de sélectionner 1 conformation du substrat parmi 10^7 autres supposées d'égale énergie, ce qui est — à proprement parler — impensable si tant est qu'un substrat de taille normale puisse prendre un si grand nombre de conformations ou d'orientations à l'intérieur de chacune de ces conformations !

a) L'AJUSTEMENT INDUIT DE KOSHLAND.

La théorie de l'ajustement induit proposée par Koshland (30- 31) implique un changement de conformation de l'enzyme provoqué par la fixation du substrat au niveau du centre actif. Ce changement de conformation permet une réorientation des entités catalytiques de l'enzyme par rapport au substrat et en rend possible la transformation chimique.

A priori, rien n'indique qu'un tel changement de conformation soit nécessaire pour l'activité de l'enzyme, cependant de nombreux résultats expérimentaux indiquent que la conformation d'une protéine enzyme peut être modifiée par la fixation d'un substrat ou d'un analogue et même d'une substance sans rapports structuraux très précis avec le substrat. Dans ce dernier cas on peut parler d'effecteur *allostérique* (32) , induisant un changement de conformation au niveau d'un site différent du centre actif, par opposition à l'effecteur *autostérique* (10) agissant au niveau du centre actif par suite de son analogie structurale avec le substrat. L'existence de sites allostériques dans les enzymes oligomères a été démontrée indiscutablement ces dernières années (33,10) et l'interprétation de leur effet sur les propriétés du centre actif nécessite, quelles que soient les modalités précises de leur action, l'implication de changements de conformation fonctionnels sur le plan de l'activité enzymatique.

Il faut d'ailleurs bien distinguer entre un simple déplacement d'équilibre par le substrat ou l'effecteur d'une forme réversiblement dénaturée vers la forme native de l'enzyme et un véritable changement de conformation induit par le substrat à partir de l'enzyme natif, ce qui n'est pas toujours facile !

Pour des enzymes plus simples (monomères) on a pu montrer par des méthodes rapides l'existence d'étapes situées entre les étapes d'adsorption et de transfor-

a - et c'est là un ordre de grandeur souvent inférieur à la réalité !

b - voir par exemple les références données à ce sujet dans la ref. 10 p. 380 à 386.

mation chimique du substrat et pouvant correspondre à un changement de conformation fonctionnel de l'enzyme dans le cas de la ribonucléase (34), de la trypsine (35) et de la phosphatase alcaline (36). Le cas de la phosphatase alcaline mérite d'ailleurs d'être souligné : le 2 hydroxy 5 nitrobenzyl phosphonate (I) de structure voisine du 4 nitrobenzyl phosphonate, inhibiteur compétitif de la phosphatase alcaline d'E. coli, se fixe sur l'enzyme suivant un processus à deux étapes étudiées par stopped flow et relaxation thermique. La première étape est très rapide et correspond à la fixation de I dans un premier complexe d'adsorption qui n'est pas observé directement car il ne met en jeu aucun changement spectral de I. Par contre cette première étape est suivie d'une seconde plus lente impliquant une modification du spectre de I : ce qui est tout à fait en faveur d'un changement de conformation induit par I.

Il faut cependant admettre que ces changements de conformation peuvent être extrêmement limités^a dans la mesure où la réorientation des entités catalytiques ne nécessite pas de réarrangements très importants de la protéine enzyme (sauf peut-être dans le cas des enzymes allostériques) : l'exemple de la thiosubtilisine est significatif à cet égard. Donc un changement de conformation fonctionnel de l'enzyme peut être extrêmement difficile à détecter.

b) ACTIONS RECIPROQUES ENZYME-SUBSTRAT.

Une autre alternative pour expliquer le rôle des changements de conformations dans la catalyse enzymatique a été discutée par Lumry (24) et Jencks (25) : la distorsion du substrat invoquée dans la théorie du rack pourrait être la conséquence d'un changement de conformation de l'enzyme lui-même induit au préalable par le substrat : c'est ce que nous nous proposons d'appeler des actions réciproques enzyme-substrat (rack dynamique d'après Lumry (24)) : dans un premier stade l'enzyme fixerait le substrat et changerait localement sa conformation, ce qui entraînerait une distorsion du substrat, ainsi une partie de l'énergie d'interaction E-S servirait à placer le substrat dans un état pré-activé au lieu d'être uniquement utilisé à réorienter les entités catalytiques, et ceci pourrait être plus rentable sur le plan énergétique car une partie de l'énergie requise globalement par le changement de conformation servirait à abaisser directement la barrière d'activation : l'enzyme se contenterait de transférer une partie de son énergie d'interaction avec le substrat d'une partie à l'autre de celui-ci au moyen d'un changement de conformation limité.

C'est surtout semble-t-il sur le plan de la spécificité que les changements de conformation de l'enzyme peuvent être importants : nous avons vu qu'il était difficile d'interpréter la spécificité uniquement en termes d'orientation du substrat car cela supposerait une sélectivité incroyable de l'enzyme, mais si le

^a Surtout sur le plan de leurs conséquences macroscopiques (variations du pouvoir rotatoire, de l'absorption ultraviolette, de la fluorescence, bien que cette dernière soit vraisemblablement plus sensible que les précédentes à de tels changements).

facteur orientation intervient au niveau de l'enzyme, et ce dernier possède certainement un plus grand nombre de conformations potentielles qu'un "petit" substrat, alors les facteurs d'orientation du substrat et de l'enzyme forment les termes d'un produit qui peut, nous semble-t-il, rendre compte de la spécificité de l'action enzymatique.

LES RESULTATS DE L'ANALYSE CRISTALLOGRAPHIQUE DES PROTEINES ENZYMES.

Certains des concepts exposés ici peuvent sembler imprécis et mal définis, et ce qui peut paraître plus grave, parfois difficilement discernables les uns des autres : c'est le cas par exemple des effets de distorsion et d'orientation car, qu'est-ce qu'une forme "contrainte" du substrat sinon une conformation instable du substrat sélectionnée par l'enzyme ?

Il faut néanmoins souligner que le bien fondé de la plupart des concepts précédents a été confirmé par l'approche la plus directe dont on dispose à l'heure actuelle, c'est-à-dire la cristallographie aux rayons X.

Dans le cas du lysozyme par exemple, Phillips et al. (19) ont montré qu'au niveau d'un des subsites de l'enzyme un résidu 2 acétamido 2 deoxyglucose du substrat naturel se trouvait dans un état contraint dans lequel la conformation "chaise" normale du substrat était remplacée par une conformation partiellement plane et ceci au voisinage immédiat de la liaison glycosidique hydrolysée par l'enzyme. De même, l'existence de plusieurs subsites au sein du centre actif de cet enzyme permet d'envisager des fixations non productives des substrats qui ont été observées cristallographiquement (36, 37).

Plus significatifs encore sont peut-être les résultats obtenus avec la ribonucléase et la chymotrypsine car ils confirment les données préalablement obtenues par voie cinétique ou modifications chimiques. Dans le cas de la ribonucléase,^b on a pu confirmer par exemple la proximité de 2 imidazoles, au site de fixation du substrat comme l'avaient envisagé Rabin (40) et Crestfield (41). De même pour la chymotrypsine, la proximité de la sérine et de l'histidine a été démontrée (35), ainsi que l'interaction isoleucine 16-aspartique 194, confirmant de façon définitive des résultats antérieurs (1, 42).

Enfin un changement de conformation très important a été observé dans le cas de la carboxypeptidase par Ludwig, Lipscomb et al. (43, 44) en présence de substrat : 1 résidu tyrosine et 1 aspartate probablement impliqués dans la catalyse sont déplacés de 15°A et de 2°A respectivement par rapport à leur position initiale. On ne saurait reprocher à Koshland de citer ce résultat comme un argument en faveur de la théorie de l'induced fit (10), mais certains résultats de ce type^a peuvent également être interprétés sur la base d'une distorsion du substrat plutôt qu'une réorientation des entités catalytiques comme conséquence d'un changement de conformation de l'enzyme : en pratique, il semble très difficile de différencier

^a Par exemple dans le cas de la phosphatase alcaline discuté ici (36).

^b voir référence 39.

l'induced fit d'actions réciproques car ces interprétations impliquent chacune des changements de conformation se distinguant seulement dans leur finalité.

Les techniques utilisant la résonance magnétique nucléaire permettront peut être dans un proche avenir d'en savoir plus long à ce sujet car elles permettent l'étude fine d'une partie précise de la protéine enzyme, d'un point de vue dynamique (45) et non pas seulement statique comme les méthodes cristallographiques.

LE CAS DE LA TRYPSINE.

La trypsine hydrolyse spécifiquement des liaisons amides, peptidiques et esters mettant en jeu le carboxyle d'un résidu lysine ou arginine. Son mécanisme d'action met en jeu deux intermédiaires au minimum dont l'acylenzyme et peut être décrit au moyen du schéma cinétique n°1.

La trypsine catalyse également l'hydrolyse de substrats non spécifiques comme l'acetyl phenyl alanine méthyl ester (APAME), l'acetyltyrosine ethyl ester (ATEE) (46) ou l'acetyl glycine ethyl ester (AGEE) (47). Mais le rapport k_{cat}/K_m qui est de l'ordre de 10^7 pour des substrats spécifiques comme le BAEE^a ou le TSAME^b passe à 10^3 pour l'ATEE et $2 \cdot 10^{-2}$ dans le cas de l'AGEE.

On a pu montrer que l'étape d'acylation est limitante ($k_2 \gg k_3$) pour les amides spécifiques (TSAA et BAA) (48) et que l'étape de désacylation est limitante pour les esters spécifiques (BAEE et TSAME) (49).

L'hydrolyse trypsique des substrats spécifiques est inhibée compétitivement par des alkylamines et des alkylguanidines ainsi que par des aryl-amines et guanidines (50,51,52). On peut penser que le subsite récepteur de la chaîne cationique des substrats spécifiques est constitué d'une crevasse hydrophobe (51) au fond de laquelle se situe un carboxyle en interaction avec la charge positive d'un groupement aminé ou guanidine du substrat (53,54,55) Il est également vraisemblable qu'il existe une interaction avec le groupement α aminé engagé dans une liaison peptidique (56).

D'autres subsites sont vraisemblablement mis en jeu dans la catalyse trypsique comme en témoignent par exemple les effets d'activation par le substrat (57) et d'effecteurs autostériques (58). L'existence de tels subsites a été démontrée par Berger dans le cas d'autres protéases comme la papaïne (59) et la carboxypeptidase (60).

L'éventualité d'un changement de conformation implique dans la catalyse trypsique a été suggérée par plusieurs approches différentes : A. d'Albis et J.J. Béchet

^a La liste des abréviations utilisées dans ce travail est donnée à la page 45 (IIIème Partie).

(55) ont constaté une variation du pouvoir rotatoire de la trypsine à des pH voisins de la neutralité en présence de certains inhibiteurs compétitifs qui protègent également l'enzyme de la dénaturation alcaline et acide.

Bernhard (35) a montré au moyen d'une méthode rapide l'existence d'un complexe supplémentaire situé entre le complexe de Michaelis ES et l'acylenzyme ES', comme l'avait déjà suggéré Johannin dans le cas de l'hydrolyse du DL BAPNA (61).

Certaines différences dans les profils d'activité en fonction du pH de la trypsine native et de formes modifiées chimiquement peuvent être également interprétées sur la base d'un tel complexe supplémentaire (62).

Par ailleurs, Inagami a montré que l'hydrolyse trypsique de l'AGEE est activée par des amines aliphatiques comme l'éthylamine (63) : ce résultat est interprétable à partir de la théorie de l'induced fit, l'éthylamine agissant comme un effecteur autostérique (10).

Cependant D. Thusius^a en analysant la fixation de la proflavine sur la trypsine par relaxation thermique n'observe qu'une étape bimoléculaire d'adsorption extrêmement rapide ($k_1 \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$).

Nous avons nous-même proposé une méthode (64) qui permet de déterminer à l'état stationnaire l'étape limitante dans le schéma 1 en introduisant un analogue nucléophile de l'eau dans le milieu réactionnel.

Comme il devient alors possible de séparer cinétiquement les étapes d'acylation et de désacylation, nous avons cherché à analyser l'expression de la spécificité trypsique à travers chacune des étapes du schéma 1 en essayant de préciser le rôle de la liaison α peptidique et de la chaîne latérale chargée des substrats spécifiques. Notre travail expérimental qui sera exposé dans la troisième partie de ce texte porte essentiellement sur les 3 points suivants :

- a) Analyse de la compétition nucléophile avec des substrats spécifiques et non spécifiques. Cette étude a été entreprise dans le but de savoir si l'étape limitante était la même pour des esters spécifiques et non spécifiques de la trypsine et le cas échéant de préciser l'étape la plus spécifique du schéma 1 (spécificité cinétique).

- b) Etude cinétique de l'hydrolyse d'un type particulier de substrats de la trypsine : les dérivés de la lysine non protégés sur leur groupement α aminé. En général, les substrats synthétiques de la trypsine sont des dérivés d'acides N acyles. Cependant un substrat comme la lysine méthyl ester est également hydrolysé par cet enzyme. De tels substrats pouvant se présenter sous deux états d'ionisation différents dans la zone d'activité de la trypsine, il nous

a - D. Thusius - Communication personnelle.

27. B.H.J. Hofstee ; *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 211
B.H.J. Hofstee ; *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 182.
28. B.H.J. Hofstee ; *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 365.
29. B.H.J. Hofstee ; *Nature*, 213 (1967) 42.
30. D.E. Koshland, dans "The Enzymes", Tome I, 1959, p. 305, édité par P.D. Boyer,
H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York.
31. D.E. Koshland, *Fed. Proceedings*, 23 (1963) 719. (Biochemistry symposium).
32. J. Monod, J.P. Changeux, F. Jacob ; *J. Mol. Biol.*, 6 (1963) 306.
33. J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux ; *J. Mol. Biol.*, 12 (1965) 88.
34. J.E. Erman, G.G. Hammes ; *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 5614.
35. S. Bernhard ; dans "The structure and function of enzymes", 1968, p. 248 à
253 , W.A. Benjamin Inc., New York.
36. S.E. Halford, N.G. Bennett, D.R. Trentham, H. Gutfreund ; *Biochem. J.*,
114 (1969) 243.
37. C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma,
Nature, 206 (1965) 757.
38. D.C. Phillips, *Sci. Am.*, 215 (1966) 78.
39. H.W. Wyckoff, K.D. Hardman, N.M. Allewell, T. Inagami, D. Tsernoglou, L.N.
Johnson, F.M. Richards ; *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 3749.
40. D.G. Heines, A.P. Mathias, B.R. Rabin ; *Biochem. J.*, 85 (1962) 127
41. A.M. Crestfield, W.H. Stein, S. Moore ; *J. Biol. Chem.*, 238 (1953) 2413 et
2421.
42. H.L. Oppenheimer, B. Labouesse, G.P. Hess ; *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2720.
43. M.L. Ludwig, J.A. Hartsuck, T.A. Steitz, H. Muirhead, J.C. Coppola, G.N.
Reeke, W.N. Lipscomb ; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 57 (1967) 511.
44. T.A. Steitz, M.L. Ludwig, F.A. Quiocho, W.N. Lipscomb ; *J. Biol. Chem.*,
242 (1967) 4662.
45. B.D. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, 91 (1969) 849.
46. T. Inagami, J.M. Sturtevant ; *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1020.
47. T. Inagami, H. Mitsuda ; *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1388.
48. J. Chevallier, J. Yon ; *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 116.
49. J.J. Béchet, J. Yon, M.C. Gardiennet ; *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 101.
50. T. Inagami ; *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 787.

51. M. Mares Guia, E. Shaw, W. Cohen ; J. Biol. Chem., 242 (1967) 5777.
52. M. Mares Guia, E. Shaw ; J. Biol. Chem., 240 (1965) 1579.
53. J.A. Stewart, J.E. Dobson ; Biochemistry, 4 (1965) 1086.
54. E.J. East, C.G. Trowbridge ; Arch. Biochem. Biophys., 125 (1968) 334.
55. A. d'Albis, J.J. Béchet ; Biochim. Biophys. Acta, 140 (1967) 435.
J.J. Béchet, A. d'Albis ; Biochim. Biophys. Acta, 178 (1969) 561.
56. M. Gorecki, Y. Shalitin ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 29 (1967) 89.
57. J.J. Béchet, J. Yon ; Biochim. Biophys. Acta, 89 (1964) 117.
58. A. Dupaix ; Thèse de 3e cycle, Orsay, 1969.
59. I. Schechter, A. Berger, Biochem. Biophys. Res. Comm., 27 (1967) 157.
60. N. Abramowitz, I. Schechter, A. Berger ; Biochem. Biophys. Res. Comm.,
29 (1967) 862.
61. G. Johannin, J. Yon ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 25 (1966) 320.
62. J. Chevallier ; Thèse de Doctorat, Orsay, 1969.
63. T. Inagami, T. Murachi ; J. Biol. Chem., 239 (1964) 1395.
64. F. Seydoux, J. Yon, European J. Biochem., 3 (1967) 42.
65. B.W. Matthews, P.B. Sigler, R. Henderson, D.M. Blow ; Nature, 214 (1967) 652.

DEUXIÈME PARTIE

Analyse cinétique des réactions enzymatiques et analyse statistique des
données expérimentales.

DEUXIEME PARTIE - ANALYSE CINETIQUE DES REACTIONS ENZYMATIQUES ET ANALYSE STATISTIQUE
DES DONNEES EXPERIMENTALES.

L'approche cinétique de la catalyse enzymatique a fait l'objet ces dernières années d'un grand nombre de publications : ceci est dû en grande partie aux progrès des méthodes d'investigation cinétique ^a et au nombre croissant des enzymes isolés et purifiés.

La démarche essentielle de cette approche consiste à se donner le schéma cinétique le plus simple possible décrivant une séquence d'actes réactionnels élémentaires et à en déduire des relations concentration-temps (état préstationnaire) ou vitesse-concentration (état stationnaire). Ces relations doivent ensuite être vérifiées à partir des données expérimentales souvent entachées d'erreurs importantes. Dans la mesure où une série de résultats numériques peut être interprétée au moyen de relations analytiquement différentes, une analyse statistique est souvent profitable quand elle permet d'orienter un choix entre plusieurs formules.

Il n'en reste pas moins qu'à deux schémas cinétiques différents peuvent correspondre des équations de vitesse identiques (schémas homeomorphes), dans ce cas des données supplémentaires sont requises pour définir le schéma le plus vraisemblable (données à l'état préstationnaire, relaxation chimique, considérations d'ordre mécanistique etc...)

Nous allons décrire succinctement les méthodes de calcul qui permettent d'établir les principales relations cinétiques à l'état pré-et stationnaire à partir d'un schéma réactionnel, puis nous traiterons dans un second chapitre des méthodes statistiques d'ajustement des paramètres d'une équation à des données expérimentales, méthodes qui ont été largement utilisées dans ce travail et qui nécessitent l'utilisation de calculateurs digitaux.

a - voir par exemple chapitre I, 3ème partie.

CHAPITRE I - ETATS STATIONNAIRE ET PRESTATIONNAIRE QUASI EQUILIBRE.

L'analyse cinétique des réactions enzymatiques n'est possible que lorsque l'on peut établir et vérifier de façon quantitative des relations entre paramètres expérimentaux. Les deux variables essentielles de la cinétique chimique sont la concentration et le temps, la première étant mesurée en fonction de la seconde : les relations concentration - temps sont donc à la base de toute expérimentation cinétique. Une autre grandeur caractéristique est la vitesse de réaction ou dérivée première de la concentration par rapport au temps, elle se déduit aisément des données concentration-temps. Des relations vitesse-concentration sont obtenues très facilement par le calcul à partir d'un schéma cinétique lorsqu'on utilise l'approximation de l'état stationnaire. Ce sont des relations analytiquement bien définies, et commodes à manipuler, aussi ce sont les plus utilisées en cinétique enzymatique, mais il ne faut pas perdre de vue qu'elles ne sont jamais vérifiées directement par l'expérience et que leur exploitation à partir des données expérimentales ne peut se faire que moyennant un certain nombre d'hypothèses.

D'une façon générale, on peut distinguer deux types de schémas cinétiques : les schémas linéaires séquencés et les schémas branchés. Dans les premiers, la réaction globale s'effectue suivant une séquence linéaire de transformations élémentaires alors que dans les seconds, il existe plusieurs voies réactionnelles pour parvenir à certains complexes intermédiaires.

Ces deux types de schémas se différencient lorsqu'on y introduit certaines approximations. Dans ce qui va suivre, nous traiterons surtout des schémas linéaires séquencés car ils sont beaucoup plus simples à étudier et semblent suffisants pour décrire l'essentiel de l'aspect cinétique de la catalyse trypsique.

Nous allons maintenant résumer brièvement l'approche cinétique formelle des réactions enzymatiques.

1 - ETAT PRE-STATIONNAIRE ET ETAT STATIONNAIRE.

Considérons une réaction enzymatique pratiquement irréversible comportant un substrat S et un produit P mettant en jeu n intermédiaires notés $X_1, \dots, X_{i-1}, \dots, X_n$, suivant une séquence linéaire de transformations élémentaires à la fin desquelles l'enzyme libre noté X_0 est régénéré.



(schéma cinétique 3)

A partir du schéma cinétique précédent, on peut écrire $n + 1$ équations différentielles :

$$\begin{aligned} \dot{X}_0 &= -k_1 X_0 S + k_{-1} X_1 + k_{n+1} X_n \\ \dot{X}_1 &= k_1 X_0 S - (k_{-1} + k_2) X_1 + k_{-2} X_2 \\ &\vdots \\ \dot{X}_i &= k_i X_{i-1} - (k_{-i} + k_{i+1}) X_i + k_{-(i+1)} X_{i+1} \\ \dot{X}_n &= k_n X_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1}) X_n \end{aligned} \quad \text{Eq (8)}$$

Avec comme conditions initiales : pour $t = 0$, $X_0 = E_T$, concentration totale de l'enzyme, $X_i \neq 0 = 0$.

Dans la mesure où S est une fonction du temps, ce système est constitué d'équations différentielles non linéaires et il ne possède pas de solution analytique exacte. On a recours à une approximation due à Gutfreund (1) et qui consiste à admettre que S est constant, ceci est vrai si l'on mesure la réaction à ses premiers instants et si $E_T \ll S_0$, concentration initiale du substrat. On peut alors écrire $S \approx S_0$, et remplacer le produit de la constante bimoléculaire k_1 et de la concentration en substrat S par la constante monomoléculaire apparente ^a $k'_1 = k_1 S_0$.

On est alors ramené à un système d'équations différentielles linéaires qu'il est commode de résoudre en remplaçant les concentrations $X_i(t)$ par leurs transformées de Laplace Carson notées $X_i(R)$ (2). On aboutit alors au système d'équations linéaires

$$\begin{aligned} RX_0 - RE_T &= -k'_1 X_0 + k_{-1} X_1 + k_{n+1} X_n \\ \dot{RX}_1 &= k'_1 X_0 - (k_{-1} + k_2) X_1 - k_{-2} X_2 \\ &\vdots \\ \dot{RX}_i &= k_i X_{i-1} - (k_{-i} + k_{i+1}) X_i + k_{-(i+1)} X_{i+1} \\ &\vdots \\ \dot{RX}_n &= k_n X_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1}) X_n \end{aligned} \quad \text{Eq (9)}$$

dans lequel figurent les transformées de Laplace-Carson $X_i(R)$ des concentrations $X_i(t)$, la transformation de Laplace-Carson étant définie ¹ par la relation :

$$X_i(R) = R \int_0^\infty X_i(t) e^{-Rt} dt$$

avec $\dot{X}_i(t) \doteq RX_i(R) - RX_i(0)$

Le système précédent peut s'écrire sous forme matricielle :

^a Ceci permet la généralisation du schéma précédent au cas d'une réaction à p substrats et q produits, la concentration de ces derniers étant supposée nulle ou constante.

$$\text{Eq (11)} \quad \begin{vmatrix} RE_T \\ 0 \\ \vdots \\ \vdots \\ 0 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} M \end{vmatrix} \begin{vmatrix} X_i \end{vmatrix}$$

expression dans laquelle M est une matrice carrée (n+1)x(n+1) ayant pour éléments les coefficients des X_i dans l'équation 9.

En appliquant les règles de Cramer, on obtient pour $X_i(R)$ l'expression :

$$\text{Eq (12)} \quad X_i(R) = RE_T (-1)^{i+2} \frac{\Delta_{1,i+1}(R)}{\Delta(R)}$$

où : $\Delta(R)$: déterminant associé à la matrice M ;

$\Delta_{1,i+1}(R)$: déterminant obtenu en supprimant la première ligne et la (i+1)^{ème} colonne de $\Delta(R)$. Le développement du déterminant $\Delta(R)$ conduit à un polynôme en R : $F_2(R)$ de degré n+1, qui est le polynôme caractéristique du système ; celui de $\Delta_{1,i+1}(R)$ conduit à un polynôme $F_1(R)$, de degré n pour i = 0 et n-1 pour i ≠ 0. Comme la somme de chaque colonne de $\Delta(0)$ est nulle, $\Delta(0) = 0$ et le polynôme $F_2(R)$ admet une racine zéro. $X_i(R)$ peut s'écrire :

$$\text{Eq (13)} \quad X_i(R) = RE_T \frac{F_1(R)}{F_2(R)}$$

On obtient aisément l'expression de $X_i(t)$, transformée inverse de $X_i(R)$ en utilisant le théorème du développement de Heaviside^a (3) :

$$\text{Eq (14)} \quad \frac{X_i(t)}{E_T} = \frac{F_1(0)}{F_2(0)} + \sum_{i=1}^n \frac{F_1(R_i)}{F_2(R_i)} e^{R_i t}$$

les R_i étant les racines non nulles du polynôme $F_2(R)$.

^aUne démonstration de la formule (14) est donnée dans la référence 2.

Le terme constant de l'expression de X_i correspond à l'état stationnaire du système ($X_i = 0$) et les n termes exponentiels à l'état pré-stationnaire ou phase transitoire de la réaction. La concentration du produit P à l'instant t : $P(t)$ est donnée par la relation :

$$P(t) = \int_0^t k_{n+1} X_n dt \quad \text{Eq (15)}$$

$$\text{d'où} \quad \frac{P(t)}{E_T} = A_0 t + \sum_{i=1}^{i=n} A_i (e^{R_i t} - 1) \quad \text{Eq (16)}$$

$$\text{avec : } A_0 = k_{n+1} \frac{F_1(0)}{F_2(0)} \quad \text{et} \quad A_i = k_{n+1} \frac{F_1(R_i)}{R_i F_2(R_i)}$$

$$\text{Lorsque } t \rightarrow \infty, \frac{P}{E_T} \rightarrow A_0 t - \sum_{i=1}^{i=n} A_i, \text{ car on peut démontrer que les racines}$$

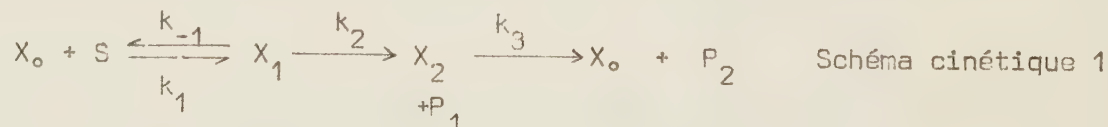
R_i sont toutes négatives (4).

L'extrapolation de la partie linéaire de la courbe $P_\ell = f(t)$ (cinétique d'ordre 0) nous fournit 2 paramètres caractéristiques de la phase transitoire

$$\tau_\ell = \sum_i A_i / A_0 \quad \text{et} \quad \pi_\ell = - E_T \sum_i A_i.$$

Dans le cas d'une réaction à plusieurs produits, τ_ℓ et π_ℓ diffèrent suivant le produit considéré, ce qui permet de savoir dans quel ordre les produits de la réaction apparaissent, cela est impossible à l'état stationnaire en présence du seul substrat^a (A_0 est indépendant du produit considéré).

L'utilisation de la transformation de Laplace-Carson simplifie énormément la résolution de tels systèmes d'équations différentielles linéaires à coefficients constants car elle permet l'introduction dès le début du calcul des conditions aux limites du système, ce qui évite la recherche d'une solution générale. Nous allons maintenant traiter en exemple le schéma classique à deux intermédiaires : complexe de Michaelis et acyl-enzyme.



avec : X_0 : enzyme libre
 X_1 : complexe de Michaelis
 X_2 : acyl-enzyme.

^aPour le cas plus général d'un schéma branché à p substrats et q produits, on se réfèrera aux calculs de Darvey (5).

P_1 et P_2 : premier et second produits de la réaction (par ordre d'apparition dans le temps).

Le schéma précédent est décrit au moyen des trois équations différentielles :

$$\begin{aligned}\dot{X}_0 &= -k'_1 X_0 + k_{-1} X_1 + k_3 X_2 \\ \dot{X}_1 &= k'_1 X_0 - (k_{-1} + k_2) X_1 \\ \dot{X}_2 &= k_2 X_1 - k_3 X_2\end{aligned}\quad \text{Eq (17)}$$

avec $k'_1 = k_1 S_0$.

Réolvons le système pour $X_1(R)$, après introduction des transformées de Laplace-Carson dans le système précédent :

$$\Delta(R) = \begin{vmatrix} k'_1 + R & -k_{-1} & -k_3 \\ -k'_1 & (k_{-1} + k_2 + R) & 0 \\ 0 & -k_2 & k_3 + R \end{vmatrix} = R^3 + bR^2 + cR = RF_2(R) \quad \text{Eq (18)}$$

avec $b = k'_1 + k_{-1} + k_2 + k_3$ et $c = k'_1 k_2 + k_3(k'_1 + k_{-1} + k_2)$

$$(-1)^3 \Delta_{1,2}(R) = - \begin{vmatrix} -k'_1 & 0 \\ 0 & k_3 + R \end{vmatrix} = k'_1 (k_3 + R) = F_1(R) \quad \text{Eq (19)}$$

$$\text{D'où } X_1(R) = E_T \frac{F_1(R)}{F_2(R)} \quad \text{Eq (20)}$$

Le polynome caractéristique $F_2(R)$ admet 2 racines R_+ et R_-

$$R_{\pm} \text{ ou } - = \frac{-b \pm (b^2 - 4c)^{1/2}}{2} \quad \text{Eq (21)}$$

et l'on obtient pour la transformée inverse $X_1(t)$ (2) :

$$\frac{X_1(t)}{E_T} = \frac{k'_1 k_3}{c} + \frac{k'_1 (k_3 + R_+)}{(2R_+ + b)} e^{R_+ t} + \frac{k'_1 (k_3 + R_-)}{R_- (2R_- + b)} e^{R_- t} \quad \text{Eq (22)}$$

$P_1(t)$ est donné par la relation :

$$\frac{P_1}{E_T} = \int_0^t k_2 \frac{X_1}{E_T} dt = \frac{k_2 k'_1 k_3}{c} t + \frac{k_2 k'_1 (k_3 + R_+)}{R_+^2 (2R_+ + b)} (e^{R_+ t} - 1) + \frac{k_2 k'_1 (k_3 + R_-)}{R_-^2 (2R_- + b)} (e^{R_- t} - 1) \quad \text{Eq (23)}$$

Un calcul analogue pour X_2 conduit à l'expression :

$$\frac{P_2}{E_T} = \frac{k_2 k'_1 k_3}{c} t + \frac{k_2 k'_1 k_3}{R_+^2 (2R_+ + b)} (e^{R_+ t} - 1) + \frac{k_2 k'_1 k_3}{R_-^2 (2R_- + b)} (e^{R_- t} - 1) \quad \text{Eq (24)}$$

constante caractéristique de l'état stationnaire pour lequel donc par définition :

$$\dot{X}_i = 0 \quad \text{avec } i = 1, 2, \dots, n \quad \text{Eq (37)}$$

Dans le cas où $S_0 \ll E_T$, on a $X_0 \approx E_T$ et un calcul identique au précédent^a montre qu'alors aucun état stationnaire ne peut être atteint.

Dans la réalité, S n'est jamais rigoureusement constant. De plus on peut démontrer (8) que l'hypothèse de l'état stationnaire n'est jamais vérifiée exactement dans le cas d'un système du type précédent si $n > 1$, (la concentration des intermédiaires ne peut atteindre simultanément au cours de la réaction un extremum pour lequel $\dot{X}_i = 0$).

On peut alors se demander si l'approximation de l'état stationnaire est valide dans ce cas. Walter (9) a montré en utilisant un calculateur analogique que l'erreur introduite par l'approximation de l'état stationnaire était le plus souvent négligeable. Cet auteur propose de définir l'état stationnaire par l'inégalité suivante :

$$|\dot{P}| \gg |\dot{X}_i| \ll |\dot{S}| \quad \text{avec } i = 1, 2, \dots, n \quad \text{Eq (38)}$$

à la place de la stricte condition $\dot{X}_i = 0$.

Finalement, l'hypothèse de l'état stationnaire se justifie plus a posteriori par les résultats qu'elle permet d'obtenir que par des considérations théoriques "a priori". Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'elle peut entraîner dans certains cas des erreurs d'interprétation importantes, mais que ces cas sont limités (8).

La résolution d'un système linéaire séquencé à l'état stationnaire ne pose aucune difficulté. Alberty (10) a traité le cas général décrit par le schéma 3 en utilisant une méthode de récurrence proposée par Christiansen (11). L'équation de vitesse est de forme michaelienne et peut s'écrire :

$$\frac{dP}{dt} = - \frac{dS}{dt} = \frac{k_{cat} E_T}{1 + \frac{K_m}{S}} = k_{app} E_T \quad \text{Eq (39)}$$

expression classique dans laquelle les constantes cinétiques k_{cat} et K_m sont des combinaisons des constantes élémentaires du schéma cinétique 3. Dans ce cas donc la forme globale de l'équation de vitesse est indépendante du nombre d'intermédiaires n (Schémas homeomorphes). Le cas des schémas branchés est plus difficile à traiter à l'état stationnaire. Il est commode d'utiliser pour leur résolution

^a Contrairement aux affirmations de Stewart et Lee (7), l'expression de P_2 est aisément dérivable dans ce cas si on utilise la transformation de Laplace Carson, car la résolution du polynôme caractéristique $F_2(P)$ de degré 3 se ramène en fait à celle d'une équation du second degré.

une technique de calcul dérivée de la théorie des graphes et proposée par Volkenstein (12)^a. Les équations de vitesse correspondantes ne sont plus de forme michaelienne et il peut y figurer des termes en S^2 ne reflétant pas la composition stoechiométrique des complexes intermédiaires qui ne contiennent qu'une molécule de substrat par molécule d'enzyme. Ceci ne doit pas être perdu de vue lorsqu'on cherche à interpréter des phénomènes non michaeliens (13).

APPROXIMATION DU QUASI EQUILIBRE.

En pratique, la complexité des équations de vitesse croît très rapidement avec le nombre des intermédiaires et des voies réactionnelles ; il devient alors impossible de les exploiter. Une nouvelle approximation (et ce sera la dernière !) consiste à admettre que dans un schéma cinétique certaines étapes réactionnelles peuvent être considérées a priori comme beaucoup plus rapides que les autres : ce sont essentiellement les étapes d'adsorption réversible du substrat et des effecteurs sur l'enzyme (formation des complexes de Michaelis, etc...) et les étapes d'ionisation des groupes fonctionnels de l'enzyme, et éventuellement du substrat. Les intermédiaires correspondant à ces étapes atteignent alors à l'état stationnaire une concentration à l'équilibre calculable à partir de la loi d'action de masse.

Considérons dans un schéma cinétique un segment contenant n espèces d'intermédiaires F_i rapidement à l'équilibre. On peut définir pour chaque espèce F_i un "facteur de concentration fractionnelle" (15) f_i tel que :

$$f_i = \frac{F_i}{\sum_{i=1}^n F_i} \quad \text{Eq. (40)}$$

Dans un schéma cinétique complexe comportant de tels segments, on peut remplacer les différents intermédiaires F_i présents dans ce segment par le symbole

$$X_i = \sum_{i=1}^n F_i \quad \text{à condition de multiplier les constantes de vitesse de transformation}$$

des F_i en intermédiaires situés à l'extérieur du segment par le coefficient fractionnaire f_i correspondant. On obtient ainsi un "graphe condensé" que l'on manipule suivant les procédés classiques.

Cette approximation du quasi équilibre simplifie énormément les calculs. Elle correspond à une réalité physique car les techniques rapides (16) ont permis de montrer que les étapes d'adsorption et d'ionisation sont limitées par la diffusion des réactifs et donc très rapides devant les étapes catalytiques et certaines éta-

^aUn exemple intéressant d'utilisation de la théorie des graphes pour des systèmes branchés est donné par A. Dupaix (14).

pes conformationnelles^a.

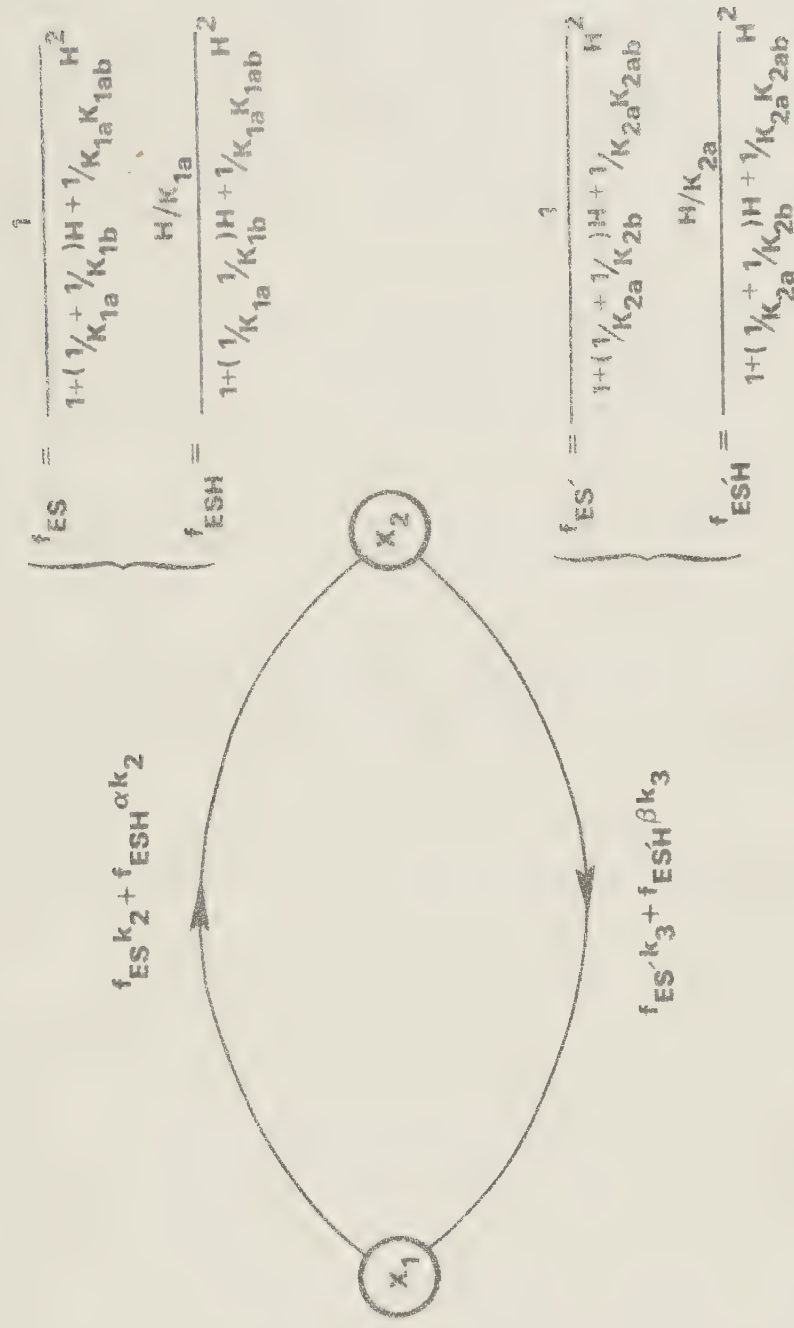
La figure (2) illustre à titre d'exemple la simplification d'un schéma cinétique (5, chapitre III, 3e partie) par application de l'approximation du quasi équilibre.

Pour terminer, il convient de remarquer que si l'application du quasi équilibre à des schémas linéaires séquencés ne modifie pas la forme globale des équations de vitesse, il n'en va pas de même avec les schémas branchés pour lesquels l'application du quasi équilibre peut modifier la forme globale de l'équation de vitesse (17).

^a Nous entendons par là des étapes où s'effectuent des modifications chimiques du substrat et de l'enzyme et celles où s'effectuent des remaniements structuraux de la protéine enzyme.

Figure 2 - Simplification du schéma cinétique 5 (3e partie, chap. III) par application de l'approximation du quasi-équilibre. $X_1 \rightarrow X_2$: étape d'acylation, $X_2 \rightarrow X_1$, étape de désacylation. Les expressions des coefficients fractionnaires de concentration f_{ES} , $f_{ES'}$ et f_{ESH} sont données en la figure .

Graphe réduit :



$$\left\{ \begin{array}{l} X_1 = E + EH + ES + EHS + ESH + EHS \\ X_2 = ES' + EHS' + ES'H + EHS'H \end{array} \right.$$

CHAPITRE II -- ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES CINETIQUES - PROGRAMMATION.

Nous avons vu au chapitre précédent comment on pouvait établir formellement à partir d'un schéma cinétique des relations concentration-temps et vitesse-concentration. Ces relations comportent un certain nombre de paramètres qui sont des constantes cinétiques et des constantes d'équilibre et qui sont à la base de tout raisonnement cinétique.

Le problème qui se pose alors à l'expérimentateur est d'évaluer ces paramètres à partir de données expérimentales souvent entachées d'erreurs importantes et de savoir, en vue de raisonnements ultérieurs, avec quelle précision ces paramètres sont obtenus et dans quelle mesure la relation utilisée rend compte des résultats expérimentaux. Ceci n'est possible qu'à partir d'une analyse statistique des données numériques.

L'analyse statistique des relations linéaires entre plusieurs variables ne pose aucun problème particulier : il suffit d'utiliser les formules classiques de regression linéaire (voir plus loin).

Le cas de relations non linéaires est plus difficile à traiter et il faut en général recourir à des méthodes itératives (18). Cleland (19) a proposé une méthode itérative particulièrement simple qui permet d'analyser les principales relations non linéaires rencontrées en cinétique enzymatique (20) à condition de disposer d'un calculateur digital.

Nous avons largement utilisé cette méthode d'itération dans ce travail et nous allons en donner maintenant le principe. Puis nous détaillerons la méthode dans un cas particulier en insistant sur la programmation des calculs.

PRINCIPE DE LA METHODE ITERATIVE.

Considérons une fonction non linéaire Y d'une variable x , de la forme $Y = f(a, b_k, x)$ où les b_k sont des paramètres constants non linéaires ($1 \leq k \leq n-1$).

Supposons que nous connaissions à priori des estimées grossières b_k^0 de ces paramètres. On peut alors écrire :

$$Y \simeq f(a, b_k^0, x) + \sum_{k=1}^{k=n-1} (b_k^1 - b_k^0) \left[\frac{\partial f}{\partial b_k} \right]_{b_1^0 \dots b_{n-1}^0} \quad \text{Eq. (41)}$$

Expression ^a dans laquelle les b_k^1 constituent une meilleure approximation des paramètres b_k que les b_k^0 : l'introduction des b_k^1 dans l'expression de Y nous en donne donc une meilleure estimation.

L'équation 41 peut se mettre sous la forme :

$$Y = \sum_{i=1}^{i=n} \alpha_i X_i \text{ (Eq. 42) , les } X_i \text{ étant de nouvelles variables s'exprimant en fonction de } x \text{ et des paramètres } b_k^0 \text{ et donc calculables a priori, les coefficients } \alpha_i \text{ s'exprimant en fonction de } a, b_k^0 \text{ et } b_k^1.$$

L'équation 42 est linéaire et on peut en déduire les valeurs des α_i par la méthode des moindres carrés.

Connaissant la forme analytique précise de la fonction Y , on peut calculer partir des α_i les nouvelles estimées b_k^1 .

Ceci constitue un cycle d'itération. On peut en effet utiliser les b_k^1 comme nouvelles estimées provisoires des paramètres b_k et poursuivre aussi l'itération jusqu'à ce que l'on juge l'estimation des b_k suffisante, c'est à dire lorsque deux estimées successives des b_k sont pratiquement confondues^b. Il est évident que cette technique itérative nécessite un calculateur numérique.

ANALYSE D'UNE REGRESSION MULTILINEAIRE PAR LA METHODE DES MOINDRES CARRÉS.

Soit une fonction linéaire Y des n variables indépendantes X_i ($1 \leq i \leq n$):

$$Y = \sum_i \alpha_i X_i \quad \text{(Eq. 42)}$$

les α_i étant les coefficients constants qu'il s'agit d'évaluer.

On considère que Y décrit correctement la dépendance d'une grandeur expérimentale y vis à vis des variables X_i , y étant mesurée pour différentes séries de valeurs des X_i . Suivant la méthode des moindres carrés qui suppose une distribution gaussienne des fluctuations de y autour d'une valeur moyenne, la meilleure estimation de Y sera obtenue en minimisant la quantité $\sum w (y-Y)^2$, la sommation s'effectuant sur la série des valeurs de y et le facteur w étant le poids statistique de chaque valeur de y .

a - Il s'agit d'un développement en série de Taylor limité au premier terme par rapport aux paramètres b_k considérés comme variables.

b - En pratique cela dépend de la précision recherchée sur les b_k .

Le poids statistique w s'introduit du fait que l'erreur absolue sur y peut varier suivant sa valeur. D'une façon générale, w est inversement proportionnel à la variance de y , $V(y)$. Si la variance des y est constante, w est identique pour chaque y et s'élimine. Si l'erreur relative sur y est constante, $V(y)$ est proportionnel à y^2 et on prendra $w = 1/y^2$. Si on effectue plusieurs mesures de y pour les mêmes valeurs des X_i , on peut alors estimer directement w et utiliser cette valeur expérimentale du i^{e} poids statistique dans les calculs. La notion de pondération s'avère très importante en pratique et le choix des poids statistiques peut considérablement modifier les résultats de l'analyse statistique, surtout lorsque les erreurs expérimentales sont importantes (8).

La quantité $\sum w (y-Y)^2$ est minimisée en annulant ses dérivées partielles par rapport à chaque α_i . On obtient alors un système d'équations linéaires du type :

$$\begin{aligned} p_1 &= \sum_i \alpha_i a_{1i} \\ \vdots & \\ p_j &= \sum_i \alpha_i a_{ji} \\ \vdots & \\ p_n &= \sum_i \alpha_i a_{ni} \end{aligned} \quad \text{Eq. 43}$$

avec $a_{ji} = \sum w X_j X_i = a_{ij}$ (44) et $p_j = \sum w y X_j$ (Eq. 45).

Le système précédent (eq.43) s'écrit sous forme matricielle :

$$|| p_j || = || a_{ij} || || \alpha_i || \quad \text{Eq. 46}$$

Equation dans laquelle $|| p_j ||$ est la matrice unicolonne ayant pour éléments les p_j , $|| a_{ij} ||$ la matrice carrée $n \times n$ symétrique formée des éléments a_{ij} et $|| \alpha_i ||$ la matrice unicolonne ayant les α_i pour éléments .

$$\text{On en déduit } || \alpha_i || = || b_{ij} || || p_j || \quad \text{Eq. 47}$$

expression dans laquelle $|| b_{ij} ||$ est la matrice inverse de $|| a_{ij} ||$. Les α_i sont alors donnés par les relations :

$$\alpha_i = \sum_j b_{ij} p_j \quad (\text{Eq.48}) \quad \text{avec } 1 \leq j \text{ ou } i \leq n$$

ANALYSE DES VARIANCES.

Une fois les b_k obtenus par itération, il s'agit d'évaluer leur variance. On démontre (21) que la matrice $||b_{ij}||$ multipliée par le scalaire σ^2 a pour éléments les variances et les covariances^a des paramètres α_i .

D'une façon générale $\sigma^2 b_{ij} = V(\alpha_i)$ (éq. 49) et $\sigma^2 b_{ij} = \text{Cov}(\alpha_i, \alpha_j)$ (éq. 50). σ^2 est le carré moyen de l'écart entre les valeurs expérimentales y et les valeurs calculées Y correspondantes (écart type). Il est défini par la relation :

$$\sigma^2 = \frac{\sum w(y - Y)^2}{N - n} \quad \text{Eq (51)}$$

où N est le nombre de valeurs expérimentales y et n le nombre de paramètres dans l'expression de Y .

Les b_k étant des fonctions des paramètres α_i , $f(\alpha_i)$, on peut calculer leur variance au moyen de la relation approchée (19) :

$$V[f(\alpha_i)] = \sum_i \left[\frac{\partial f(\alpha_i)}{\partial \alpha_i} \right]^2 V(\alpha_i) + 2 \sum_{j \neq i} \sum_{j \neq i} \frac{\partial f(\alpha_i)}{\partial \alpha_i} \frac{\partial f(\alpha_j)}{\partial \alpha_j} \text{Cov}(\alpha_i, \alpha_j) \quad \text{Eq (52)}$$

où $V(\alpha_i)$ est la variance du paramètre α_i et $\text{Cov}(\alpha_i, \alpha_j)$ la covariance des paramètres α_i et α_j .

L'erreur standard sur les paramètres b_k (S.E(b_k)) est égale à la racine carrée de leur variance.

EXEMPLE D'APPLICATION.

Illustrons maintenant la méthode par un exemple précis : celui de l'équation de vitesse non michaelienne décrivant le phénomène d'activation d'une réaction enzymatique par le substrat et qui peut s'écrire (23) :

$$y = \frac{a(x + bx^2)}{1 + cx + dx^2} \quad \text{Eq (53)}$$

où y est la vitesse et x la concentration en substrat. Cette équation est linéaire en a , non linéaire en b , c et d :

^aLa notion de covariance de 2 variables s'introduit lorsque ces deux variables ne sont pas statistiquement indépendantes, sinon leur covariance est nulle.

Appliquons la relation (41), il vient :

$$y = \frac{a(x + b_0 x^2)}{1 + c_0 x + d_0 x^2} + a(b_1 - b_0) \frac{x^2}{1 + c_0 x + d_0 x^2} + (c_0 - c_1) a \frac{(1 + b_0 x) x^2}{(1 + c_0 x + d_0 x^2)^2} + (d_0 - d_1) a \frac{(1 + b_0 x) x^3}{(1 + c_0 x + d_0 x^2)^2} \quad \text{Eq. (54)}$$

et y peut se mettre sous la forme :

$$y = \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_4 X_4 \quad \text{Eq. (55)}$$

avec :

$$X_1 = \frac{x(1 + b_0 x)}{1 + c_0 x + d_0 x^2} \quad X_2 = \frac{x^2}{1 + c_0 x + d_0 x^2} \quad \text{Eq. (56)}$$

$$X_3 = \frac{X_1 X_2}{x} \quad \text{et} \quad X_4 = X_1 X_2$$

$$\alpha_1 = a \quad \alpha_2 = a(b_1 - b_0) \quad \alpha_3 = a(c_0 - c_1) \quad \alpha_4 = a(d_0 - d_1), \quad \text{Eq. (57)}$$

ce qui constitue une régression quadrilinéaire sans terme constant. On minimise

la quantité^a $\sum \left[\frac{y - \hat{y}}{y} \right]^2$ en la dérivant par rapport à $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ et α_4 et en annulant ces dérivées, on obtient alors pour les 10 éléments de la matrice symétrique $||a_{ij}||$ les expressions :

$$\begin{aligned} a_{11} &= \sum X_1^2 / y^2 & a_{44} &= \sum X_4^2 / y^2 & a_{14} &= \sum X_1 X_4 / y^2 \\ a_{22} &= \sum X_2^2 / y^2 & a_{12} &= \sum X_1 X_2 / y^2 & a_{23} &= \sum X_2 X_3 / y^2 \\ a_{33} &= \sum X_3^2 / y^2 & a_{13} &= \sum X_1 X_3 / y^2 & a_{24} &= \sum X_2 X_4 / y^2 \\ & & & & a_{34} &= \sum X_3 X_4 / y^2 \end{aligned} \quad \text{Eq. (58)}$$

^aNous avons pris en général $w = 1/y^2$ dans ce travail plutôt que $w = 1$, car l'évaluation de l'erreur relative sur les vitesses expérimentales montre qu'elle est sensiblement constante quel que soit l'ordre de grandeur de la vitesse mesurée.

et pour les 4 éléments de la matrice unicolonne $||p_j||$:

$$p_1 = \sum X_1 / y ; p_2 = \sum X_2 / y ; p_3 = \sum X_3 / y ; p_4 = \sum X_4 / y \quad \text{Eq. (59)}$$

On calcule ensuite les éléments b_{ij} de la matrice inverse $||b_{ij}||$ à partir des a_{ij} en utilisant par exemple la méthode d'élimination de Gauss.

Les coefficients α_i sont donnés par les relations :

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= b_{11}p_1 + b_{12}p_2 + b_{13}p_3 + b_{14}p_4 \\ \alpha_2 &= b_{12}p_1 + b_{22}p_2 + b_{23}p_3 + b_{24}p_4 \\ \alpha_3 &= b_{13}p_1 + b_{23}p_2 + b_{33}p_3 + b_{34}p_4 \\ \alpha_4 &= b_{14}p_1 + b_{24}p_2 + b_{34}p_3 + b_{44}p_4 \end{aligned} \quad \text{Eq. (60)}$$

et les nouvelles estimées b_1 , c_1 et d_1 sont calculées à partir des équations suivantes tirées des relations 57 :

$$b_1 = \frac{\alpha_2}{\alpha_1} + b_0 \quad c_1 = c_0 - \frac{\alpha_3}{\alpha_1} \quad d_1 = d_0 - \frac{\alpha_4}{\alpha_1} \quad \text{Eq. (61)}$$

Les paramètres qu'il est intéressant de connaître du point de vue cinétique à partir de l'équation 53 sont : a , a/c , $1/c$, ab/d , c/d et ab/c (23). Leur variance se calcule en utilisant la formule 52 compte tenu du fait qu'en fin d'itération^a $\alpha_1 \gg \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$, on obtient ainsi :

$$V(a) = V(\alpha_1) \quad \text{Eq. (62)}$$

$$V(a/c) = \frac{1}{c^2} V(\alpha_1) + \frac{1}{c^4} V(\alpha_3) + \frac{2}{c^3} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_3) \quad \text{Eq. (63)}$$

$$V(1/c) = \frac{\alpha_3^2}{\alpha_1^4 c^4} V(\alpha_1) + \frac{1}{\alpha_1^2 c^4} V(\alpha_3) - \frac{2\alpha_3}{\alpha_1^3 c^4} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_3) \quad \text{Eq. (64)}$$

$$\begin{aligned} V(ab/d) &= \frac{b^2}{d^2} V(\alpha_1) + \frac{1}{d^2} V(\alpha_2) + \frac{b^2}{d^4} V(\alpha_4) + 2 \frac{b}{d^2} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_2) \\ &\quad + 2 \frac{b^2}{d^3} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_4) + 2 \frac{b}{d^3} \text{Cov}(\alpha_2, \alpha_4) \end{aligned} \quad \text{Eq. (65)}$$

^aEn fin d'itération, $y \approx \alpha_1 X_1$, car $b_1 \approx b_0$, etc...

$$V(c/d) = \left[\frac{\alpha_3 d - \alpha_4 c}{\alpha_1^2 d^2} \right]^2 V(\alpha_1) + \frac{1}{\alpha_1^2 d^2} V(\alpha_3) + \frac{c^2}{\alpha_1^2 d^4} \text{Var}(\alpha_4) \quad \text{Eq. (66)}$$

$$- 2 \frac{\alpha_3 d - \alpha_4 c}{\alpha_1^3 d^3} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_3) + 2c \frac{\alpha_3 d - \alpha_4 c}{\alpha_1^3 d^4} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_4) - 2 \frac{c}{\alpha_1^2 d^3} \text{Cov}(\alpha_3, \alpha_4)$$

$$V(ab/c) = \frac{b^2}{c^2} V(\alpha_1) + \frac{1}{c^2} V(\alpha_2) + \frac{b^2}{c^4} V(\alpha_3) + 2 \frac{b}{c^2} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_2) \quad \text{Eq. (67)}$$

$$+ 2 \frac{b^2}{c^3} \text{Cov}(\alpha_1, \alpha_3) + 2 \frac{b}{c^3} \text{Cov}(\alpha_2, \alpha_3)$$

Avec $V(\alpha_1) = \sigma^2 b_{11}$, $V(\alpha_2) = \sigma^2 b_{22}$, $\text{Cov}(\alpha_1, \alpha_2) = \sigma^2 b_{12}$, etc..., Eq. (68)

σ^2 étant calculé au moyen de la relation :

$$\sigma^2 = \frac{\sum \left[\frac{y - Y}{y} \right]^2}{N - n} = \frac{N + \alpha_1^2 a_{11} - 2 \alpha_1 p_1}{N - 4} \quad \text{Eq. (69)}$$

où N est le nombre de valeurs y, et n = 4 car l'équation 53 contient 4 paramètres constants.

Il est évident que ces calculs ne peuvent être effectués qu'à l'aide d'un calculateur programmable. Nous allons donc maintenant décrire la programmation du calcul précédent.

PROGRAMMATION D'UN CALCUL ITERATIF : DESCRIPTION DU PROGRAMME PS3.

Il nous semble important de donner ici la description d'un programme itératif car peu d'enzymologistes sont encore familiers avec les notions même élémentaires de programmation, et peu de programmeurs connaissent les problèmes de la cinétique enzymatique.

Le calculateur électronique Wang dont nous disposons dans ce travail est composé d'une série d'éléments modulaires^a qui permettent essentiellement^b :

^a 1 unité électronique centrale 362E, 1 clavier 370-2, 2 lecteurs de carte, 1 bloc de mémoires auxiliaires à 16 registres 372, 1 télétype avec unité de contrôle 377.

^b Pour plus de détails concernant les principes de programmation, on se réfèrera aux deux volumes du manuel d'instruction édité par Wang Laboratories.

- La programmation par carte perforée (80 niveaux d'instructions par carte) avec sauts, boucles et décisions logiques.

- La programmation par bande perforée avec possibilité de renvois carte → bande et vice versa, avec un nombre illimité d'instructions^a

- L'impression de caractères numériques et alphanumériques.

Ce calculateur dispose de 40 mémoires au maximum ce qui s'est révélé suffisant pour la plupart de nos calculs.

Le programme de calcul PS3 (régression quadrilinéaire) utilise 3 cartes et 2 bandes perforées (1 bande circulaire d'itération et 1 bande de sortie). La bande 1 comprend successivement la série d'instructions suivantes :

Entrée des données, calcul des a_{ij}

- a) Remise à zéro des mémoires adressées en Add Full.
- b) Données numériques : couples x-y avec renvois (search 1 → Mark 1^b, continue) sur cartes pour le calcul des éléments a_{ij} , p_j , qui sont sommés directement dans les mémoires Add Full (addition du contenu du registre de travail w au contenu préalable de la mémoire).
- c) Transfert du contenu des mémoires Full dans les sous registres H_A et H_B (nécessité due au nombre insuffisant des mémoires Add Full pour le programme PS3).

Inversion de la matrice $||a_{ij}||$:

- d) Calcul des mineurs Δb_{ij} .
- e) Calcul du déterminant Δ associé à la matrice $||a_{ij}||$.
- f) Calcul des éléments b_{ij} . Ces calculs s'effectuent avec un renvoi à des sous-programmes (Mark 2 à 4) perforés sur carte.
- g) Calcul des α_i .
- h) Calcul des paramètres b_1 , c_1 et d_1 et préparation du test "skip if > 0". C'est ici en effet que le calculateur doit décider s'il doit poursuivre ou arrêter l'itération. Les nouvelles estimées b_1 , c_1 et d_1 sont stockées en mémoire à la place des précédentes b_0 , c_0 et d_0 , puis on forme la somme :

$$\left(\frac{b_1 - b_0}{b_0} \right)^2 + \left(\frac{c_1 - c_0}{c_0} \right)^2 + \left(\frac{d_1 - d_0}{d_0} \right)^2$$

^aEn pratique, on est limité par la longueur de bande, soit environ 800 instructions pour une longueur de 2 mètres.

^bLes instructions Mark "X" servent à repérer le début d'un programme ou d'un sous-programme. Les instructions search "X" amènent le calculateur au Mark "X" correspondant.

et on soustrait cette quantité d'un seuil positif stocké en mémoire, puis on retourne sur la carte 2 au Mark 5 (search 5). On y trouve le test "skip if > 0", c'est-à-dire que si le contenu de w est > 0, soit

$$\left(\frac{b_1 - b_0}{b_0} \right)^2 + \left(\frac{c_1 - c_0}{c_0} \right)^2 + \left(\frac{d_1 - d_0}{d_0} \right)^2 < \text{seuil, le calculateur saute les}$$

deux instructions suivantes qui sont "search 1", et qui renvoient en début d'itération. A la suite de ces deux instructions on trouve un stop, l'itération s'arrête donc là si le résultat du test est positif.

Le choix de la valeur du seuil dépend de la précision recherchée sur les paramètres b, c et d. Par exemple, si on veut une précision meilleure que 1 % (il est rarement nécessaire de faire mieux en pratique étant donnée l'erreur expérimentale sur y), le seuil aura pour valeur $(10^{-2})^2 = 10^{-4}$.

Une fois l'itération terminée, il suffit d'introduire la bande de sortie (Bd 2) dans le lecteur de bande, pour imprimer les résultats et calculer les erreurs standards des paramètres (on peut utiliser une carte supplémentaire pour ces calculs).

Le détail des instructions des cartes 1a, 1b et 2 du programme PS3a (équation 53) ainsi que celui de la bande d'itération est donné dans les pages suivantes. Le schéma de principe des programmes itératifs est donné dans la figure (3).

Dans le tableau 1 nous avons donné les principales relations utilisées dans ce travail traitées et programmées suivant la même méthode d'itération. Il convient de remarquer que la bande d'itération de ces programmes ne dépend que du type de la régression linéaire, c'est-à-dire du nombre de paramètres figurant dans les relations. La programmation de nouvelles relations comprenant 4 paramètres au plus ne nécessiterait donc que la modification des 2 cartes d'entrées (1a et 1b, partie a du calcul) et de la bande de sortie. Pour des relations à plus de 4 paramètres^a, il serait nécessaire d'utiliser une méthode de triangulation pour inverser la matrice $||a_{ij}||$, méthode qui nécessite des éléments modulaires de calcul que notre système ne possède pas dans sa configuration actuelle. La nécessité d'introduire en début d'itération des estimées provisoires des paramètres non linéaires n'est pas vraiment gênante car l'itération converge assez rapidement comme le montre la figure (4), ce qui permet d'utiliser des estimations assez grossières de ces paramètres au début du calcul.

Dans ce travail, les estimées provisoires des paramètres non linéaires ont été obtenues à partir de représentations graphiques. Il est toujours préférable de représenter graphiquement les résultats expérimentaux, surtout lorsqu'ils peuvent être linéarisés au moyen d'une représentation adéquate (représentation

^aEn pratique, ces relations nécessiteraient pour être vérifiées un nombre considérable de valeurs expérimentales précises.

Principales relations non linéaires rencontrées dans ce travail et analysées au moyen de la méthode itérative décrite dans le texte

Type de fonction	Phénomène décrit	Type de la régression	Désignation du programme	Paramètres calculés (avec l'erreur standard)
$y = \frac{ax}{x + b}$ (a)	saturation michaelienne	Bilinéaire	PS1a	a, b, a/b
$y = \frac{a}{x + b}$ (a)	inhibition totale, effet du pH.	bilinéaire	PS1b	a, b
$y = a \frac{1 + cx}{1 + dx}$ (a)	inhibitions partielles activation	trilinéaire	PS2a	a, b, c, ac/b
$y = a(x + b(1 - e^{-ex}))$ (b)	état préstationnaire acylenzyme	trilinéaire	PS2c	a, ab, c
$y = \frac{a(1 + bx)}{1 + cx + dx^2}$ (a)	effet du pH	quadrilinéaire	PS3b	a, b, c, d
$y = \frac{a(x + bx^2)}{1 + cx + dx^2}$ (a)	activation par le substrat	quadrilinéaire	PS3a	a, 1/c, a/c, ab/d c/d, ab/c

(a) Relation vitesse-concentration ; (b) Relation concentration-temps ; (d) voir chapitre IV, 3e partie
 (e) Voir chapitre I, 3e partie ; (f) voir chapitre III, 3e partie ; (g) voir chapitre II, 3e partie

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Mark	7		40	75	75	
01	-	61		41	Rec dir	27	
02	Read 1	22		42	65	65	
03	St dir	26		43	X2	45	
04	66	66		44	Add F	12	
05	Clear Ar	50		45	60	60	
06	+AR	52		46	Rec dir	27	
07	X2	45		47	66	66	
08	enter	41		48	X2	45	
09	Rec dir	27		49	enter	41	
10	61	61		50	Rec AL	55	
11	X=	46		51	÷ =	47	
12	+AR	52		52	enter	41	
13	Clear AL	54		53	Rec AR	51	
14	-	61		54	÷ =	47	
15	+AL	56		55	Clear AL	54	
16	Rec dir	27		56	+AL	56	
17	62	62		57	Add F	12	
18	S/R	3		58	77	77	
19	"1"	1		59	Rec AL	55	
20	+AL	56		60	X2	45	
21	Rec dir	27		61	Add F	12	
22	63	63		62	61	61	
23	enter	41		63	Rec AL	55	
24	Rec dir	27		64	enter	41	
25	65	66		65	Rec dir	27	
26	X2	45		66	65	65	
27	+AL	56		67	X=	46	
28	÷ =	47		68	Add F	12	
29	enter	41		69	64	64	
30	Rec AR	51		70	Rec AL	55	
31	X=	46		71	enter	41	
32	enter	41		72	Rec dir	27	
33	Read 1	22		73	65	65	
34	Clear AR	50		74	enter	41	
35	+AR	52		75	Rec AR	51	
36	÷ =	47		76	X=	46	
37	St dir	26		77	Clear AR	50	
38	65	65		78	+AR	52	
39	Add F	12		79	X2	45	

$$\sum \text{codes} = 3561$$

Mark 1: calcul
des arj et des p's

adresses memoires

seul : dir 60
b₀ : dir 61
c₀ : dir 62
d₀ : dir 63

List of operations.

00		40	
01	Stop	41	Enter
02	Search	42	Log ₁₀ X
03	Search & Return	43	e ^x
04	Return	44	√x
05	Skip If +	45	X ²
06	Continue	46	X =
07	Mark	47	+ =
370-380 370-2-380-2			
10	Store 0 (Store Hs)	50	Clear AR
11	Store 1 (Store HA)	51	Recall AR
12	Store 2 (Add Full)	52	+ AR
13	Store 3 (Store Full)	53	- AR
14	Recall 0 (Recall Hs)	54	Clear AL
15	Recall 1 (Recall HA)	55	Recall AL
16	Recall 2 (Sub Full)	56	+ AL
17	Recall 3 (Recall Full)	57	- AL
20	Skip If Overflow	60	0
21	Control	61	1
22	Read 1	62	2
23	Read 2	63	3
24	Write 1	64	4
25	Write 2	65	5
26	Store Dir	66	6
27	Recall Dir	67	7
30	Skip If 0	70	8
31		71	9
32	Store Ind	72	
33	Recall Ind	73	
34		74	
35		75	
36	Group 1	76	Clear Display
37	Group 2	77	Change Sign

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	OddF	12		40	67	67	
01	63	63		41	Rec dir	27	
02	Rec dir	27		42	66	66	
03	65	65		43	clear AL	54	
04	enter	44		44	+AL	56	
05	Rec AR	51		45	Rec dir	27	
06	X=	46		46	76	76	
07	OddF	12		47	+AL	56	
08	66	66		48	St dir	26	
09	Rec AL	55		49	76	76	
10	enter	44		50	Rec dir	27	
11	Rec AR	51		51	77	77	
12	X=	46		52	+AR	52	
13	OddF	12		53	St dir	26	
14	70	70		54	77	77	
15	Rec AR	51		55	clear AR	50	
16	enter	44		56	1	61	
17	Rec dir	27		57	+AR	52	
18	66	66		58	Rec dir	27	
19	÷ =	47		59	73	73	
20	St dir	26		60	+AR	52	
21	66	66		61	St dir	26	
22	X ²	45		62	73	73	
23	OddF	12		63	Search	2	
24	62	62		64	1	61	
25	Rec AR	51		65	Mark	7	
26	S/R	3		66	"4"	1	
27	1	1		67	enter	44	
28	OddF	12		68	Rec dir	27	
29	71	71		69	66	66	
30	Rec dir	27		70	X=	46	
31	65	65		71	Return	4	
32	S/R	3		72			
33	"4"	1		73			
34	OddF	12		74			
35	65	65		75			
36	Rec AL	55		76			
37	S/R	3		77			
38	"4"	1		78			
39	OddF	12					

$$\sum \text{codes} = 2942$$

List of operations.

00		40	
01	Stop	41	Enter
02	Search	42	Log ₁₀ x
03	Search & Return	43	e ^x
04	Return	44	√x
05	Skip If +	45	x ²
06	Continue	46	X=
07	Mark	47	+ =
370-380 370-2-380-2			
10	Store 0 (Store Ho)	50	Clear Ar
11	Store 1 (Store Ha)	51	Recall Ar
12	Store 2 (Add Full)	52	+ Ar
13	Store 3 (Store Full)	53	- Ar
14	Recall 0 (Recall Ho)	54	Clear AL
15	Recall 1 (Recall Ha)	55	Recall AL
16	Recall 2 (Sub Full)	56	+ AL
17	Recall 3 (Recall Full)	57	- AL
20	Skip If Overflow	60	0
21	Control	61	1
22	Read 1	62	2
23	Read 2	63	3
24	Write 1	64	4
25	Write 2	65	5
26	Store Dir	66	6
27	Recall Dir	67	7
30	Skip If 0	70	8
31		71	9
32	Store Ind	72	
33	Recall Ind	73	
34		74	
35		75	
36	Group 1	76	Clear Display
37	Group 2	77	Change Sign

No.	Cmd	Code	Comment	No.	Cmd	Code	Comment
00	Mark	7		40	3	63	
01	2	62		41	Clear Ar	50	
02	S/R	3		42	S/R	3	
03	10	10		43	12	12	
04	Clear Ar	54		44	S/R	3	
05	S/R	3		45	12	12	
06	11	11		46	S/R	3	
07	S/R	3		47	12	12	
08	10	10		48	S/R	3	
09	S/R	3		49	12	12	
10	11	11		50	search	2	
11	S/R	3		51	3	63	
12	10	10		52	Mark	7	
13	S/R	3		53	12	12	
14	11	11		54	Read 1	22	
15	search	2		55	enter	41	
16	2	62		56	Read 1	22	
17	Mark	7		57	X =	46	
18	10	10		58	+AR	52	
19	Read 1	22		59	Read 1	22	
20	Clear Ar	50		60	Return	4	
21	+AR	52		61	Mark	7	
22	enter	41		62	4	64	
23	Read 1	22		63	Read 1	22	
24	enter	41		64	enter	41	
25	Read 1	22		65	Rec dir	27	
26	X =	46		66	76	76	
27	Return	4		67	÷ =	47	
28	Mark	7		68	Search	2	
29	11	11		69	4	64	
30	+AL	56		70	Mark	7	
31	Read 1	22		71	5	65	
32	enter	41		72	skip f +	5	
33	Read 1	22		73	search	2	
34	enter	41		74	1	61	
35	Rec Ar	54		75	stop.	1	
36	X =	46		76			
37	-AL	57		77			
38	Return	4		78			
39	Mark	7		79			

$$\sum \text{codes} = 1907$$

Mark 2 : calcul Δ big

Mark 3 : calcul Δ x_i

Mark 4 : calcul big

Mark 5 : test ship
4 +

List of operations.

00		40	
01	Stop	41	Enter
02	Search	42	Log _e x
03	Search & Return	43	e ^x
04	Return	44	$\sqrt{x}$
05	Skip If +	45	x ²
06	Continue	46	X =
07	Mark	47	+ =
370-380 370-2-380-2			
10	Store 0 (Store Ho)	50	Clear Ar
11	Store 1 (Store MA)	51	Recall Ar
12	Store 2 (Add Full)	52	+ AR
13	Store 3 (Store Full)	53	- AR
14	Recall 0 (Recall Ho)	54	Clear AL
15	Recall 1 (Recall MA)	55	Recall AL
16	Recall 2 (Sub Full)	56	+ AL
17	Recall 3 (Recall Full)	57	- AL
20	Skip If Overflow	60	0
21	Control	61	1
22	Read 1	62	2
23	Read 2	63	3
24	Write 1	64	4
25	Write 2	65	5
26	Store Dir	66	6
27	Recall Dir	67	7
30	Skip If 0	70	8
31		71	9
32	Store Ind	72	
33	Recall Ind	73	
34		74	
35		75	
36	Group 1	76	Clear Display
37	Group 2	77	Change Sign

Détail de la Bande d'itération (Bd 1)
Programme PS3. (voir texte).

a

>

OKOK1K2K3K4K5K6K7K8K9K>K-V;V>V-
B1

b

c

0010011102120313041405150616071708180919
0>H00-H1W>H2W-H3W;H4

A

d

B2

M1FM2FM3FM9FM9FM7FM8FM9FM7FM3FM8FM7FM9FM8FM2FV4
M0FM2FM3FM9FM9FM5FM6FM9FM5FM3FM6FM5FM9FM6FM2FV5
M0FM1FM3FM8FM8FM4FM6FM8FM4FM3FM6FM4FM8FM6FM1FV6
M0FM1FM2FM7FM7FM4FM5FM7FM4FM2FM5FM4FM7FM5FM1FV7
M4FM9FM9FM2FM3FM5FM7FM3FM8FM9FM6FM8FM2FM7FM9FV8
M4FM7FM3FM8FM9FM5FM8FM8FM1FM3FM6FM1FM9FM7FM8FV9
M4FM8FM2FM7FM9FM5FM1FM9FM7FM8FM6FM7FM7FM1FM2FV:
M0FM8FM9FM7FM3FM5FM4FM3FM6FM8FM6FM6FM7FM4FM9FV;
M0FM7FM9FM8FM2FM5FM5FM8FM4FM9FM6FM4FM2FM5FM7FV<
M0FM7FM8FM1FM9FM4FM4FM9FM5FM8FM6FM5FM1FM4FM7FV.

e

B3

M0FW4FFM4FW8FFM5FW9FFM6FW:FV>F

f

B4

W4FVW5FV5W6FV6W7FV7W8FV8W9FV9W:FV:W;FV;W<FV<W.FV.

g

B3

W4FLOFFW8FL1FFW9FL2FFW:FL3FV>F
W8FLOFFW5FL1FFW;FL2FFW<FL3FV-F
W9FLOFFW;FL1FFW6FL2FFW.FL3FH5F
W:FLOFFW<FL1FFW.FL2FFW7FL3FH6F

h

V-!W>',=!W1'%(+W1=V1
L5!W>',/!W2'% +W2=V2
L6!W>',/!W3'% +W3=V3
W0*B5

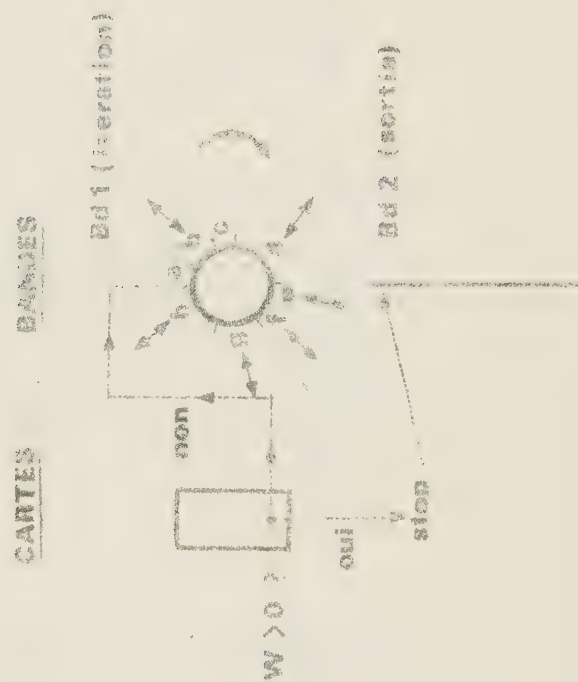
Signification des symboles utilisés pour décrire
le contenu de la bande 1.

S	: store Full	O	: recall Full
1	: store H _A	M	: recall H _A
H	: store H _B	L	: recall H _B
V	: store direct	W	: recall direct

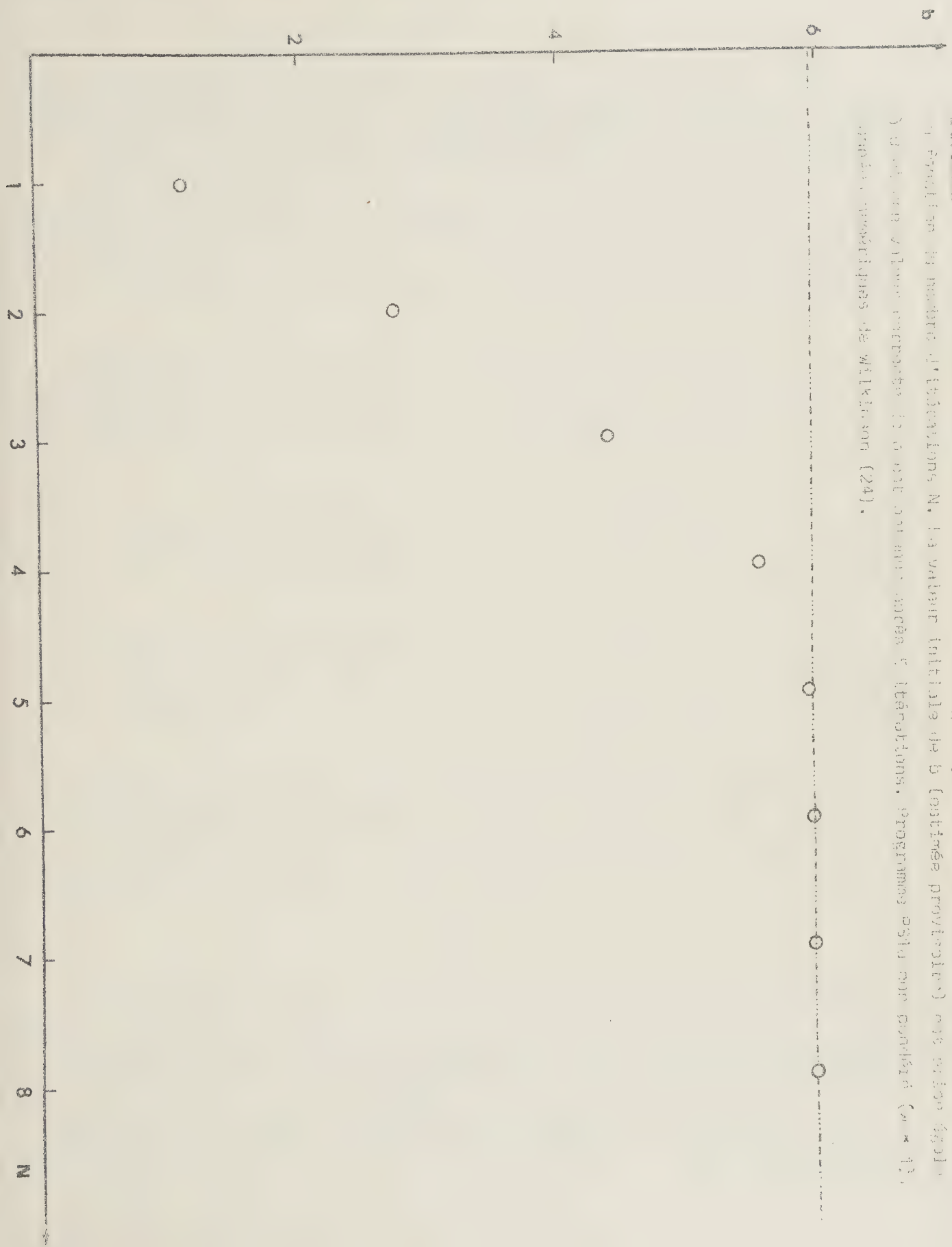
0	60	6	66	<	74
1	61	7	67	.	75
2	62	8	70	>	76
3	63	9	71	-	77
4	64	:	72		
5	65	;	73		

*	: continue	!	enter	(	clear A _R	,	clear A _L
.	: stop	/	x ²	)	recall A _R	?	recall A _L
.	: search	'	≠	*	+ A _R	=	+ A _L
				+	- A _R	/	- A _L

Figure 3 - Schéma de principe (simplifié) des programmes I et II. PS. Les flèches doubles indiquent les correspondances à la décision logique du test "skip if > 0", les flèches simples indiquent les aller-retour bande-carte. Les différentes parties du calcul sur la bande d'itération (sur 11) sont indiquées par les lettres a, b, c, d, etc... (voir texte).



22.20.6 Variation de l'estime de b pour la fonction $\frac{ax}{x+b}$ (équation de Michaelis-Menten avec $a = 10^4$)
 a) Evolution du nombre d'itérations N, la valeur initiale de b (estimée provisoire) est prise égale
 à 10 et on varie l'opérateur de 0,01 jusqu'à 100 itérations. Programme 231 est fourni (N = 1).
 b) Les propriétés de Wilkinson (24).



d'Eadie dans le cas de l'équation de Michaelis par exemple). Ceci permet en effet d'éliminer a priori les points aberrants (bien qu'on puisse également les éliminer de façon rigoureuse par l'analyse statistique (22)) et de vérifier que la relation utilisée rend bien compte en première analyse des résultats expérimentaux.

Tous les programmes utilisés dans ce travail ont été testés sur des exemples numériques. Dans le cas de l'équation de Michaelis, les valeurs de K_m , de V_m et leur erreur standard obtenues en utilisant les données numériques de Wilkinson (24) (voir figure 4) sont pratiquement confondues avec celles données par cet auteur et identiques à celles données par Bliss et James (25) qui utilisent une méthode statistique plus rigoureuse que la nôtre^a.

Le temps mis par le calculateur pour effectuer un cycle d'itération n'excède pas quelques minutes^b et, en général, il faut effectuer 3 à 4 cycles d'itération au maximum pour obtenir des valeurs correctes des paramètres non linéaires à partir de données dont l'écart type σ est de l'ordre de quelques %. Dans ce cas en effet les estimations graphiques sont en général assez voisines de l'estimation statistique.

La valeur des erreurs standards données dans ce travail correspond à la variabilité intraexpérimentale, c'est-à-dire à la variabilité des mesures au sein d'une même expérience. La variabilité interexpérimentale, c'est-à-dire la variabilité des mesures effectuées au sein d'expériences distinctes est en général plus importante.

Les calculs précédents ont tous été pondérés en utilisant $w = 1/y^2$. La comparaison des résultats obtenus avec $w = 1/y^2$ ou $w = 1$ indique des variations appréciables des estimations, surtout lorsque l'écart type est important, mais en général ces estimations restent comprises à l'intérieur de la fourchette définie par les erreurs standards.

Pour terminer, il convient d'insister sur l'utilité d'un calculateur facile à programmer pour des recherches cinétiques. L'expérimentateur dispose ainsi d'un moyen très souple et relativement puissant pour vérifier quantitativement des équations cinétiques décrivant des phénomènes souvent mesurés avec une faible précision expérimentale et ainsi savoir quel degré de signification il peut accorder à ses résultats. Ceci se traduit en pratique par un gain de temps appré-

^a Nous trouvons $K_m = 0,5965 \pm 0,0683$ et $V_m = 0,6904 \pm 0,0368$; Wilkinson donne $K_m = 0,595 \pm 0,064$ et $V_m = 0,690 \pm 0,036$, et Bliss et James : $K_m = 0,5966 \pm 0,0683$ et $V_m = 0,6904 \pm 0,0368$; ces auteurs utilisent la méthode du maximum de vraisemblance plus rigoureuse que celle des moindres carrés (21), mais qui finalement donne les mêmes résultats sur un exemple numérique.

^b Cleland, qui a programmé les mêmes calculs en langage Fortran, donne des temps de calcul de quelques secondes, mais il utilise des calculateurs beaucoup plus puissants que le nôtre.

ciable et par une certaine marge de sécurité dans la progression de la recherche. Nul doute que les calculateurs prendront une place de plus en plus importante dans l'arsenal des techniques biochimiques comme en témoigne le nombre croissant des publications à ce sujet^a.

^aOn consultera par exemple les comptes rendus de l'école d'été du FEBS "Computing techniques in biochemistry", organisée par J.H. Ottaway (FEBS Letters, volume 2, supplément Mars 1969).

BIBLIOGRAPHIE

1. H. Gutfreund ; Discussions Faraday Soc., 20 (1955) 167.
2. N.M. Rodiguin, E.N. Rodiguina, dans "Consecutive chemical reactions" édité par R.F. Schneider, 1963, D. Van Nostrand Company, Princeton.
3. A. Angot ; Compléments de Mathématiques, éditions de la revue d'optique, Paris, 1961, p. 514.
4. J.Z. Hearon ; Ann. N.Y. Acad. Sci., 108 (1963) 36.
5. I.G. Darvey ; J. Theoret. Biol., 19 (1968) 215.
6. L. Faller, J.M. Sturtevant ; J. Biol. Chem., 241 (1966) 4825.
7. J.A. Stewart, H.S. Lee ; J. Phys. Chem., 71 (1967) 3888.
8. C.F. Walter, Steady state applications in enzyme kinetics. The Ronald Press Company, New York, 1965.
9. C.F. Walter , M.F. Morales ; J. Biol. Chem. , 239 (1964) 1277.
10. L. Peller, R.A. Alberty ; J. Am. Chem. Soc., 81 (1959) 5907.
11. J.A. Christiansen ; Z. Physik. Chem., 28 B (1935) 303
J.A. Christiansen ; Z. Physik. Chem., 33 B (1936) 145.
12. M.V. Volkenstein, B.N. Goldstein ; Biochim. Biophys. Acta, 115 (1966) 471.
13. S. Ainsworth, J. Theoret. Biol., 19 (1968) 1.
14. A. Dupaix ; Thèse de 3e cycle, Orsay, 1969.
15. S. Cha ; J. Biol. Chem., 243 (1968) 820.
16. M. Eigen, G.G. Hammes ; Adv. in Enzymology, 25 (1963) 1.
17. W.P. London ; Bull. Math. Biophys., 30 (1968) 253.
18. E.J. Williams ; Regression analysis, John Wiley and Sons Inc., New York, 1959, p. 59.
19. W.W. Cleland ; Adv. en Enzymology, 29 (1967) 1.
20. W.W. Cleland ; Nature, 198 (1963) 463.
21. C.A. Bennett, N.L. Franklin; Statistical analysis in Chemistry and the Chemical Industry, John Wiley and Sons Inc., New York, 1967.
22. D.T. Elmore, A.E. Kingston, D.B. Shields ; J. Chem. Soc., 1963, part 2, 2070.
23. J.J. Béchet, J. Yon ; Biochim. Biophys. Acta, 89 (1964) 117.
24. G.N. Wilkinson ; Biochem. J., 80 (1961) 324.
25. C.I. Bliss, A.T. James, Biometrics, 22 (1966) 573.

TROISIEME PARTIE

Résultats Expérimentaux

C H A P I T R E I

MATERIEL ET METHODES.

I - SUBSTRATS, EFFECTEURS ET ENZYME.

a) Substrats et effecteurs.

La plupart des substrats utilisés dans ce travail sont des produits commerciaux utilisés tels quels ou recristallisés dans certains cas.

L'AGPNE^a (Cyclo Chemical Corporation) a été recristallisée deux fois dans l'éthanol ou dans un mélange méthanol-éther, le point de fusion obtenu est de 126° (Litt. 126-128° ; réf. 1). L'AGEE est un produit Schuchard, il a été redistillé sous pression réduite puis recristallisé dans l'éther (point de fusion 46-47°, Litt. 47°5-48, réf. 2). Le paranitrophénylacétate est un produit E. Kodack, recristallisé 2 fois dans un mélange éthanol-eau (point de fusion 76°, Litt. 77-78°, réf. 3). Le paranitrophénol (Fluka) a été recristallisé une fois dans l'éthanol.

La LME et la LEE ont été préparées suivant les méthodes usuelles (4). Les points de fusion obtenus sont respectivement 212-213° (Litt. 212°, réf. 5) et 142° (Litt. 143-144°, réf. 4). Ces produits se sont révélés homogènes à la chromatographie.

La L-lysine paranitrophénylester a été préparée à partir de la lysine (Fluka) transformée en α , ϵ dicarbobenzoxyllysine par action du chlorure de carbo-benzoxyle puis couplée avec le paranitrophénol en présence de dicyclohexylcarbo-diimide dans l'acétate d'éthyle, la dicarbobenzoxyllysine paranitrophénylester ainsi obtenue a été décarbobenzoxylée par HBr 40 % dans l'acide acétique glacial.

La TME, le L et D BAEE, la BGEE, l'APAME sont des produits Mann Research Laboratories (M.A) utilisés en solution sans purification ultérieure. L'hydrolyse trypsique complète du L BAEE donne un titre en acidité identique à ± 2 % près en moyenne au titre pondéral. La TOME, la CLPNE, et la LA sont des produits Cyclo Chemical Corporation (Grade I) utilisés sans purification ultérieure. Le LPA est un produit Nutritional Biochemicals Corporation utilisé tel quel.

Le NPGb nous a été généreusement donné par le Professeur E. Shaw que nous remercions bien vivement.

Les monoalcools utilisés dans ce travail sont des produits Prolabo, redistillés avant usage. Les diols sont des produits Aldrich, redistillés ou recristallisés dans l'isopropanol.

Les tampons utilisés (TES, MES, Tris)^a sont des produits Calbiochem (A grade).

^aLa liste des abréviations utilisées est donnée à la page suivante.

LISTE DES ABREVIATIONS NON USUELLES UTILISEES DANS CE TEXTE^a

SUBSTRATS, EFFECTEURS :

ALME	α N acétyl lysine méthylester.
AGEE	acétyl glycine éthylester.
AGPNE	acétyl glycine paranitrophénylester.
AME	arginine méthylester.
APAME	acétyl phénylalanine méthylester.
ATEE	acétyl tyrosine éthylester.
BAA	α N benzoyl arginine amide.
BAEE	α N benzoyl arginine éthylester.
BAME	α N benzoyl arginine méthylester.
BAPA	α N benzoyl arginine paranitroanilide.
BGEE	benzoyl glycine éthylester.
BLME	α N benzoyl lysine méthylester.
CLPNE	α N carbobenzoxyl lysine paranitrophénylester.
LA	lysine amide.
LEE	lysine éthylester.
LME	lysine méthylester.
LPA	lysine paranitroanilide.
NPA	paranitrophényl acétate.
NPGB	paranitrophénylester de l'acide p guanidino benzoïque.
TME	tyrosine méthylester.
TOME	α N tosyl ornithine méthylester.
TSAA	α N tosyl arginine amide.
TSAME	α N tosyl arginine méthylester.
TLCK	α N tosyl lysine chlorométhylcétone.

^a Lorsqu'aucun indice L ou D ne précède dans le texte le sigle désignant un substrat ou un effecteur, il est sous entendu qu'il s'agit du dérivé de l'acide L correspondant.

TAMPONS :

MES	acide 2 (N morpholino) éthane sulfonique
TES	acide N Tris (hydroxyméthyl-2 amino éthane sulfonique

Les amines utilisées dans ce travail (voir chapitre IV) ont été redistillées puis pesées et neutralisées par HCl 2 N. Le titre ainsi obtenu correspond à $\pm 2\%$ près au titre pondéral. Les solutions de chlorhydrates ainsi préparées, conservées plusieurs mois au réfrigérateur (5°C) ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec des solutions fraîchement préparées. Dans certains cas, nous avons directement transformé l'amine en chlorhydrate en la neutralisant par une solution éthanolique d'HCl : le chlorhydrate obtenu a été recristallisé dans des mélanges éthanol-éther. Le tableau 2 indique l'origine, le point d'ébullition des principales amines utilisées dans ce travail ou encore le point de fusion des chlorhydrates correspondants.

En général, toutes les solutions ont été préparées dans CaCl_2 0,025 M et conservées au réfrigérateur (5°C). Dans le cas des paranitrophénylesters, les solutions ont été préparées dans HCl N/1 000, CaCl_2 0,025 M, afin de limiter au maximum l'hydrolyse spontanée importante de ces composés ; leur degré de pureté a été vérifié en effectuant une hydrolyse alcaline complète dans HONa 0,1 N et en titrant spectrophotométriquement le paranitrophénol libéré, en tenant compte du paranitrophénol libre présent initialement dans la solution. En général la quantité de paranitrophénol libérée en fin d'hydrolyse correspond à plus de 95% de la valeur théorique.

Afin d'éviter des dilutions trop importantes des substrats peu solubles dans le milieu réactionnel (cas des paranitrophénylesters), nous avons préparé des solutions de tampons concentrées (1 ou 0,8 M) qui sont diluées directement dans le milieu réactionnel (0,1 ml dans 3 ml en général), le pH ainsi obtenu est reproductible au 1/100e près, et les solutions tampons se conservent plusieurs mois au réfrigérateur sans variations appréciables du pH.

b) Enzyme.

1) Purification de la trypsine.

Deux lots différents de trypsine Worthington ont été utilisés dans ce travail (T.W 6187 et TR 7 JA). Il s'agit d'une trypsine de boeuf deux fois cristallisée et conservée dans 50 % environ de MgSO_4 (TW 6187) ou dans 40 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (TR 7 JA). Ces deux lots ont donné des résultats cinétiques absolument identiques.

La trypsine (30 à 40 mg/ml) est dialysée 36 h environ contre HCl N/100 puis la fraction dénaturée irréversiblement est précipitée en ajustant la solution à une concentration molaire en NaCl (7).

La trypsine native est séparée du précipité par centrifugation ou par filtration sur millipore (GSWP 025 00 GS 0,22 μ) puis redialysée 24 h contre HCl N/100, CaCl_2 0,025 M. La concentration finale de la trypsine ainsi traitée est généralement comprise entre 20 et 30 mg/ml. Les solutions d'enzyme sont conservées au réfrigérateur à 5° environ, plus de 15 jours sans perte notable d'activité^a. La concentration totale en protéine est évaluée par une mesure spectrophotométrique à 278 m μ en prenant $1/\epsilon_{1\text{ mg}}^{1\text{ cm}} = 0,63$.

^a Celle-ci n'est sensible qu'à partir de 3 semaines environ.

T A B L E A U N° 2

Origine, point d'ébullition et point de fusion (chlorhydrate) des principales amines utilisées dans ce travail.

Amines	Point d'ébullition		Point de fusion du chlorhydrate		Origine
	trouvé	Litt. ^a	trouvé	Litt. ^a	
1 amino-éthane	-	16,6	105	109-110	E.K.
" propane	-	49	156	157-158	FLUKA
" butane	77,5	77-78	208	195	E.K.
" pentane	103	104	220	225*	FLUKA
" hexane	b	129-130	225	218*	FLUKA
" heptane	b	155	-	203*	FLUKA
" octane	b	179,6	200	198-199*	FLUKA
cyclopropylamine	50	50	-	-	ALDRICH
2 amino-propane	32	33	154	153-155	FLUKA
" butane	63	63	143	-	FLUKA
" pentane	89,5-91	91,5	146	168	ALDRICH
" hexane	116,5	116-118	103	102	K & K
" heptane	141	142	-	81-83	ALDRICH
" octane	163-164	163	88-90	90-91	FLUKA

*Voir réf. 6

^aD'après "Dictionary of organic compounds", Eyre and Spottiswoode Publishers, 1965.

^bDistillés sous pression réduite.

2) Titrage du centre actif.

Le titrage de la trypsine a été effectué avec le paranitrophénylacétate et un titrant plus spécifique, le NPGB (8).

Dans le cas du paranitrophénylacétate, la valeur du jet de paranitrophénol Π mesurée à différentes concentrations de substrat est extrapolée à concentration infinie de ce dernier au moyen d'une représentation linéaire $\sqrt{\Pi}$ vs $\sqrt{\Pi}/S$ d'après l'équation 33 (2e partie).

$$\Pi = E_T \left(\frac{k_2}{k_2 + k_3} \right)^2 / \left(1 + \frac{K_m}{S_0} \right)^2$$

On obtient ainsi pour K_m une valeur moyenne de $7 \pm 2 \cdot 10^{-5}$ M à pH 4,85, CaCl_2 0,025 M, en bon accord avec celle donnée par Bender (9)^a. Le pourcentage de centre actif^b obtenu est au maximum de 90 %, les valeurs observées variant de 83 à 90 % suivant la préparation.

Si on porte la valeur de la constante de vitesse k obtenue à l'état pré-stationnaire en fonction de la concentration de S , on obtient approximativement une droite passant par l'origine, ce qui d'après l'équation 32 (2e partie) indique que : $k_2 \gg k_3$ et que $S \ll K_s$, et donc en conséquence que $\Pi_\infty = E_T$.

Le jet observé est rigoureusement proportionnel à la concentration totale d'enzyme.

Les titrages effectués avec le NPGB (pH 8,45, CaCl_2 0,025 M, $S \approx 10^{-4}$ M) donnent sensiblement le même titre pour chaque préparation que celui obtenu avec le paranitrophénylacétate (83 et 89 % pour les deux préparations testées).

Les pourcentages de centre actif ainsi obtenus sont très supérieurs à ceux reportés par Bender (9) et légèrement supérieurs à ceux donnés par Shaw avec une trypsine purifiée par chromatographie sur sulfoéthyl Sephadex à pH 7 en présence de benzamidine (10).

^aEn présence de NaCl 0,5 M, la constante k est augmentée d'un facteur 2,5 environ ce qui correspond vraisemblablement à une diminution d'un même facteur du K_m .

^bCe pourcentage est obtenu en appliquant la relation :

$$\% \text{ centre actif} = \frac{\Pi_\infty}{\Delta \epsilon_\lambda E_0} \times 100$$

dans laquelle Π est la valeur du jet extrapolée à concentration infinie de substrat, $\Delta \epsilon_\lambda$ la différence des coefficients d'absorption du paranitrophénol et du paranitrophénylester à la longueur d'onde λ utilisée (voir tableau 3) et E_0 la concentration en protéine totale estimée par mesure de l'absorption ultraviolette.

Récemment, Kezdy [11] a démontré l'hétérogénéité de la trypsine Worthington par titration avec le NPGb, en relation avec les résultats de Shaw (10). Par contre, comme en témoigne la figure 5, dans le cas d'un titrage avec le paranitrophénylacétate, l'apparition du paranitrophénol en fonction du temps est rigoureusement décrite par la relation 32^a, ce qui implique un enzyme homogène en apparence. Il est possible que cette différence entre nos résultats et ceux de Kezdy soit due au fait que dans le cas du paranitrophénylacétate, $k = k_2/K_S$ alors qu'avec le NPGb, $k = k_2$ (12), les valeurs du rapport k_2/K_S dans le cas du paranitrophénylacétate étant identiques pour les différentes formes de trypsine à la différence de k_2 dans le cas du NPGb. Quoiqu'il en soit, aucune hétérogénéité de la trypsine n'a pu être décelée cinétiquement dans ce travail et nous n'en avons donc pas tenu compte.

L'activité spécifique de la trypsine mesurée sur L BAEE 10^{-3} M, CaCl_2 0,025 M, pH 8,0, est en moyenne de $23,15 \pm 0,89 \text{ sec}^{-1}$ (moyenne d'erreur standard portant sur 18 préparations), ce qui correspond à une activité spécifique de 26 sec^{-1} pour un enzyme actif à 100 %.

II - METHODES D'INVESTIGATION CINETIQUES.

a) Méthodes potentiométriques.

La méthode potentiométrique à pH constant précédemment décrite (13) a été largement utilisée dans ce travail. Elle donne de bons résultats pour des concentrations d'ester supérieures à 10^{-4} M, le volume utilisé variant de 3 à 10 ml.

On peut ainsi déterminer des vitesses initiales sur les premiers % de la réaction. Cette méthode est probablement la plus précise de celles que nous avons utilisées comme en témoigne la bonne reproductibilité obtenue avec les mesures d'activité spécifique de la trypsine sur le BAEE.

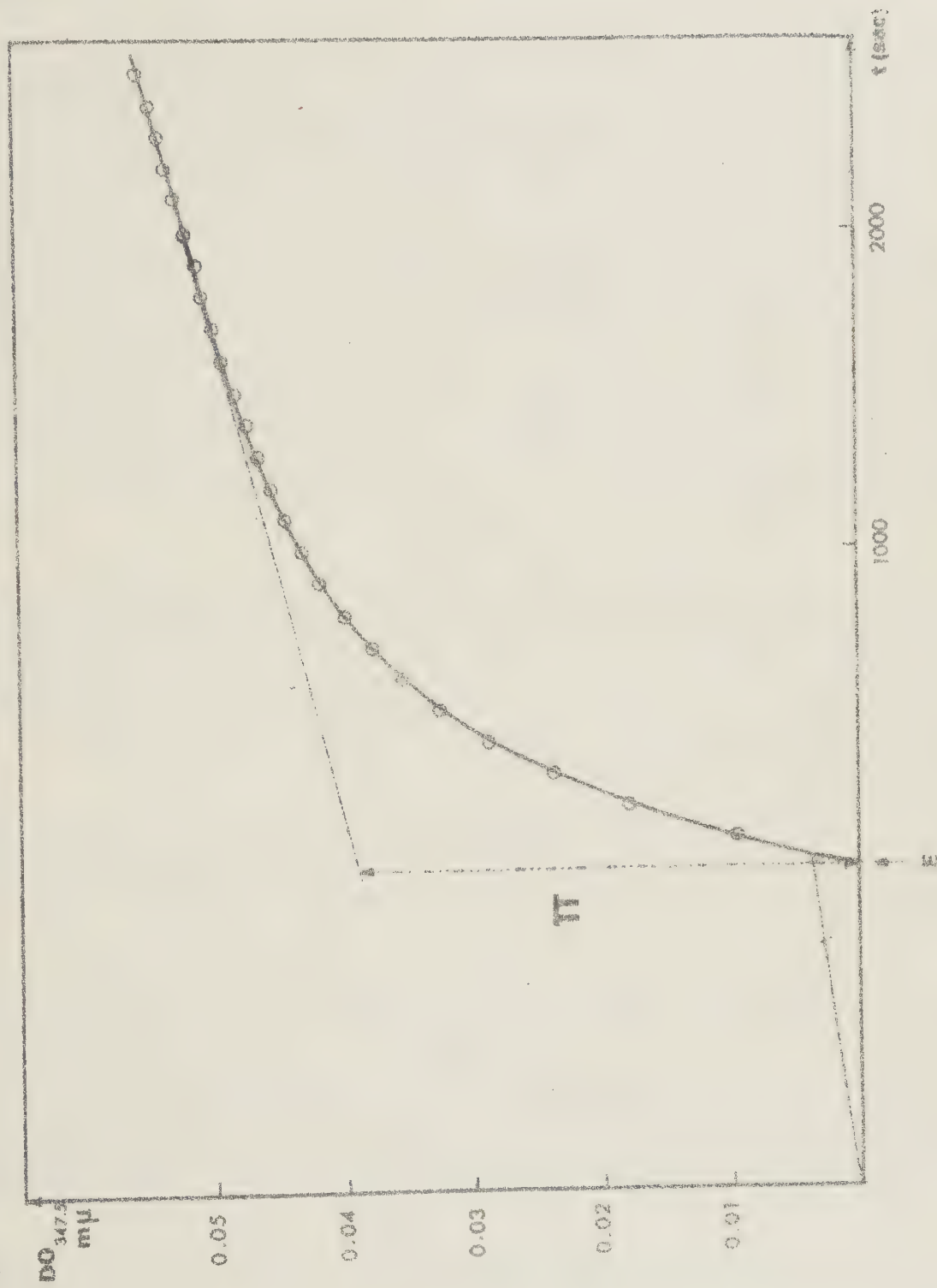
On peut réduire considérablement la dérive en utilisant des récipients hermétiques en plastique, ce qui s'est révélé très utile lorsqu'on travaille sur des substrats aspécifiques comme l'AGEE.

Dans certains cas cependant, cette technique n'est plus suffisamment sensible lorsqu'il s'agit de travailler sur des concentrations d'ester inférieures à 10^{-4} M. Nous avons alors utilisé une méthode "balistique", qui consiste à enregistrer la variation du pH en fonction du temps, au moyen d'un enregistreur potentiométrique Tacussel, le milieu réactionnel étant légèrement tamponné (tampons $2 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-3} M environ).

Si la variation du pH est de l'ordre de quelques centièmes, elle est proportionnelle à la variation relative de la concentration des protons du milieu réactionnel suivant l'équation :

^a De même en présence d'amines activant la réaction (cf. chapitre IV).

Figure 5 - Cinétique d'apparition du parénilthiophenol au cours de l'hydrolyse du substrat est déterminé d'après la valeur de Π , $C_0 = 0,032$ M), 25° , CaCl_2 $0,025$ M, NaCl $0,5$ M, $S = 1,05 \cdot 10^{-3}$ M, $E_T = 193$ γ/ml (déterminé expérimentalement, la courbe est calculée à partir $216,3$ γ/ml (déterminé par absorption ultraviolette). Les points sont expérimentaux, la courbe est calculée à partir des valeurs numériques obtenues au moyen du programme de calcul PS2c, soit $a = (0,656 \pm 0,031)10^{-6}$ $\Delta\text{DO} \cdot \text{sec}^{-1}$, $b = (0,597 \pm 0,008)105$ sec et $c = (2,716 \pm 0,007)10^{-3}$ sec^{-1} dans l'équation correspondante donnée dans le tableau 1 de la 2e partie.



droite en pointillés correspond à l'état stationnaire, l'hydrolyse spontanée du substrat est déterminée par la valeur de Π . L'origine de l'échelle de DO est arbitraire.

$$\Delta pH = \frac{1}{2,303} \frac{\Delta H^+}{H^+} \quad (70)$$

si $\Delta H^+ \ll H^+$, $\Delta pH = C \times \Delta H^+$ où C est une constante.

En pratique, on utilise l'échelle étalée du pHmètre EIL Vibron 33 B permettant d'obtenir la pleine déviation de l'enregistreur pour $\Delta pH \approx 10^{-1}$ ou 5.10^{-2} . Le milieu réactionnel est étalonné en y ajoutant des microquantités de soude ou d'HCl N/100 au moyen d'une micropipette Eppendorf. La variation de pH est linéaire en fonction du volume de titrant ajouté, ce qui permet d'évaluer la constante C. En fait il s'est souvent avéré que l'étalonnage du milieu n'était pas très reproductible (variations allant jusqu'à 10 % d'une expérience à l'autre), ce qui constitue la principale limitation de la méthode ; cependant elle est utile dès qu'il s'agit de travailler avec des concentrations faibles d'ester : nous avons pu par exemple travailler sur des concentrations de BAEE aussi faibles que 10^{-6} M, ce qui est rigoureusement impossible avec la méthode potentiométrique classique. Dans ce cas d'ailleurs, il est nécessaire de faire barboter de l'azote plusieurs heures dans le milieu réactionnel afin d'éliminer presque complètement la dérive acide qui risque d'interférer avec la réaction enzymatique.

b) Méthode spectrophotométrique.

Deux spectrophotomètres Cary 14 et 16 ont été utilisés dans ce travail. L'un d'entre eux, le Cary 16, a été spécialement conçu pour des études cinétiques ; il permet de déceler des variations de D.O. de l'ordre de 10^{-4} de façon reproductible dans l'UV et est muni d'un porte cuve rotatif pouvant recevoir cinq cellules et permettant donc d'effectuer simultanément cinq cinétiques, l'enregistrement de la variation de la densité optique en fonction du temps étant assuré au moyen d'un enregistreur Sefram Graphispot.

Pour donner une idée de la sensibilité de cet appareil, il nous a été possible d'effectuer des déterminations du K_m d'hydrolyse trypsique du BAEE au moyen de l'équation de Michaelis intégrée à des concentrations de substrat de l'ordre de 5.10^{-6} , ce qui correspond à une variation de densité optique à 252 mμ de l'ordre de 5.10^{-3} .

Le spectrophotomètre Cary 16 est thermostaté au niveau du porte cuve et de l'enceinte entourant ce dernier. La température peut être mesurée directement dans les cuves au moyen d'un thermocouple Phillips "Thermocoax".

La méthode spectrophotométrique a été largement utilisée dans ce travail pour les paranitrophénylesters, les valeurs de $\Delta \epsilon$ (ϵ paranitrophénol- ϵ ester) sont données dans le tableau 3 pour les différentes longueurs d'onde utilisées (320, 347,5 et 360 mμ en général), ainsi que les coefficients d'extinction molaire ϵ du paranitrophénol utilisés pour les titrages effectués avec le NPGB.

La procédure expérimentale peut être décrite comme suit : la solution de paranitrophénylester (dans HCl N/1000, $CaCl_2$ 0,025 M) est utilisée immédiatement

T A B L E A U N° 3

Valeurs des coefficients d'extinction molaire des principaux paranitrophénylesters
utilisés dans ce travail.

Composé	λ (m μ)	ϵ ou $\Delta\epsilon^a$	Conditions
CLPNE	320	8 220	pH = 4,80 CaCl ₂ 0,025 M Tampon acétate 0,032 M
	320	8 140	pH = 4,80 CaCl ₂ 0,025 M
	347,5 ^b	5 040	Tampon acétate 0,032 M
paranitrophénylacétate	360	2 990	
paranitrophénol	347,5 ^b	5 520	pH = 8,47
	402	17 670	Tampon Tris 0,031 M
	410	16 630	CaCl ₂ 0,025 M
	402	18 475	
	410	17 370	HONa 0,1 N
	347,5 ^b	5 640	

^aDans le cas des paranitrophénylesters : $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{paranitrophénol}} - \epsilon_{\text{paranitrophénylester}}$.

^bPoint isobeste

après sa préparation et pipetée dans les cuves au moyen d'une micropipette Pedersen (volumes variant de 50 à 3 000 μ l). Le tampon est ajouté juste avant la mesure. Toutes les solutions utilisées sont soigneusement filtrées sur millipores. On laisse les cuves s'équilibrer en température 10 minutes environ, tout en enregistrant l'hydrolyse spontanée du substrat, puis on ajoute l'enzyme au moyen d'un plongeur constitué d'une cupule hémisphérique (diamètre 6 mm environ) percée en son centre d'un trou d'un diamètre de 1 mm environ et placée à l'extrémité d'une tige de verre. Le mélange de l'enzyme au milieu réactionnel est ainsi réalisé en moins de dix secondes.

On enregistre la variation de la densité optique en fonction du temps pendant quelques minutes durant lesquelles un jeu de cinq cuves est à nouveau préparé. On peut ainsi effectuer une trentaine de cinétiques en deux heures, ce qui s'est révélé très précieux dans les cas des paranitrophénylesters labiles. Le pH du milieu réactionnel est vérifié immédiatement après les mesures. La concentration exacte de l'ester peut être vérifiée en titrant spectrophotométriquement le paranitrophénol libéré par hydrolyse enzymatique totale ou hydrolyse alcaline.

$$\text{et } K_m = K_s \frac{k_3 + k_4 N}{k_2 + k_3 + k_4 N} \quad \text{Eq. (74)}$$

Ces équations ont été discutées en détail précédemment (14). Suivant les ordres de grandeur respectifs de k_2 et de k_3 , trois cas importants peuvent être distingués, $k_4 N$ étant du même ordre de grandeur que k_3 : cas I si $k_3 \ll k_2$, cas II si $k_2 \ll k_3$ et cas III si $k_2 \sim k_3$; ces cas sont affectés de l'indice P_1 , P_2 ou P_3 suivant le produit considéré. Ces différents cas sont résumés graphiquement dans la figure 6.

II. RESULTATS DE LA COMPETITION NUCLEOPHILE AVEC DES SUBSTRATS SPECIFIQUES ET NON SPECIFIQUES.

Le rapport k_4/k_3 qui est une mesure de la réactivité apparente de l'alcool par rapport à l'eau a été trouvé compris entre 1,6 et 2,3 pour le méthanol et une série de 7 acyltrypsines différentes (voir tableau 4), le produit titré étant soit P_1 , dans le cas des paranitrophénylesters, avec $S \gg K_m$, soit P_2 avec les esters méthyliques et éthyliques, avec $S \ll K_m$, ce qui indique une réactivité relative voisine de ces acyltrypsines vis-à-vis du méthanol par rapport à l'eau et en outre, une contribution d'éventuels effets de solvant à l'effet nucléophile observé apparemment négligeable ou du moins constante d'une acyltrypsine à l'autre.

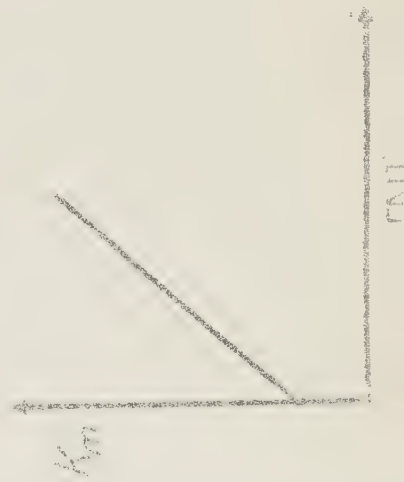
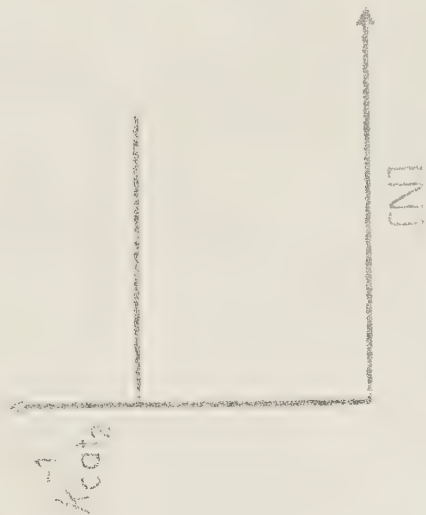
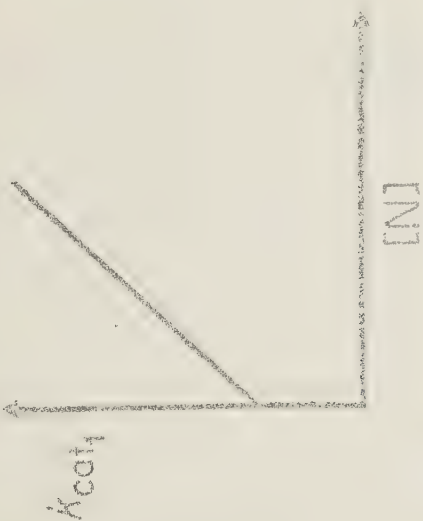
Un certain nombre d'arguments ont été donnés par J.J. Béchet (15) en faveur d'une étape de desacylation limitante pour les esters spécifiques et d'une étape d'acylation limitante pour les esters non spécifiques^a. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris d'étudier l'effet du méthanol 2 M sur les paramètres k_{cat2} (produit P_2 titré) et K_m d'hydrolyse trypsique de substrats spécifiques (L BAEE et L LME) et non spécifiques (D BAEE, L TME et L TOME), les effets de solvant inhérents à l'introduction d'un alcool dans le milieu réactionnel étant évalués au moyen d'isopropanol 0,6 M, la concentration choisie donnant la même constante diélectrique D globale du milieu réactionnel que dans le méthanol 2 M. ($D = 75,7$ au lieu de $78,5$ dans l'eau à 25°) (16) et le choix de l'isopropanol se justifiant par le fait que cet alcool secondaire est très peu réactif en tant que nucléophile (17). Les résultats obtenus sont donnés dans les figures 7,8 et 9 et le tableau 5. Les mesures cinétiques ont été effectuées en suivant l'apparition du produit P_2 par la méthode potentiométrique à pH constant ou la méthode balistique (D BAEE). Les paramètres k_{cat2} et K_m ont été estimés au moyen du programme PS1a pondéré ($w = 1/y^2$).

Dans le cas du L BAEE, nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique à 252 mμ ($\Delta\epsilon_{BA/BAEE} = 1\ 100$) et l'évaluation des paramètres k_{cat2} et K_m a été effectuée au moyen de la représentation de Michaelis intégrée :

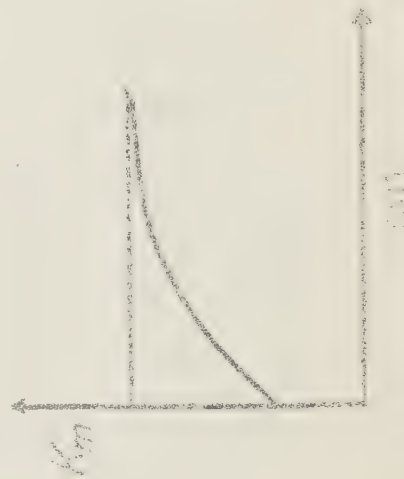
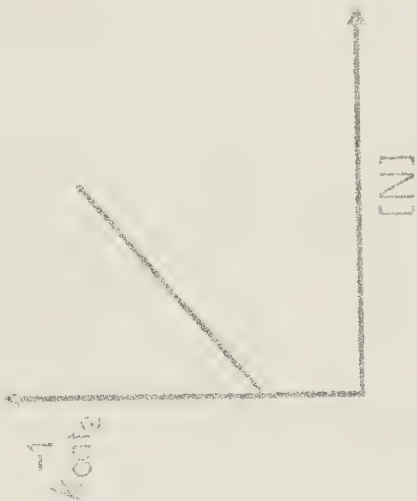
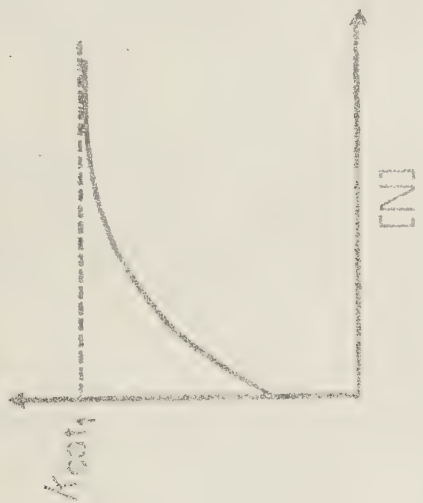
^a Il s'agit ici d'esters méthyliques ou éthyliques et non pas d'esters paranitrophénoliques.

Figure 9 - Effet d'un enzyme nucléophile N sur les paramètres cinétiques k_{cat1} , k_{cat2} et K_m suivant l'étape limitante de la réaction.

$$k'_3 \ll k_2$$



$$k'_3 \sim k_2$$



$$k_2 \ll k'_3$$

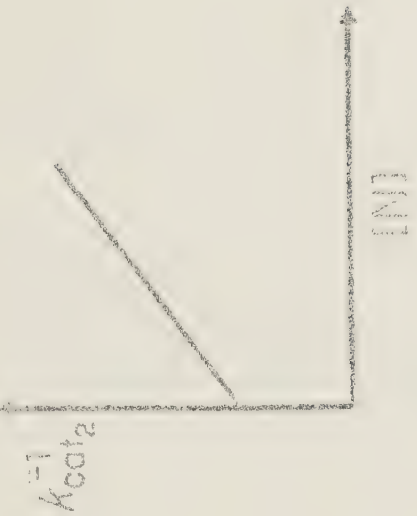


TABLEAU N° 4

Effet de monoalcools $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{CH}_2\text{OH}$ sur l'hydrolyse trypsique de substrats spécifiques et non spécifiques, à 25°, CaCl_2 0,025 M.

k_4/k_3 pour n^a :

	1	2	3	4	5	6	7
L BAEE ^a	1.65						
D BAEE ^a	1.90		1.07		8.30		
L LME ^b	2.05	.76	1.41	5.76	9.20	18.30	34.00
L AME ^b	1.62		1.14	4.65	6.50	14.10	
L CLPNE ^c	1.64		1.48	4.72	8.50	11.80	20.60
L APAME ^a	1.72	.80	1.83	4.85	6.30		
NPA ^d	2.25		.62	3.25	5.80	10.50	

a pH 8,0, produit P_2 titré, $S \ll K_m$

b pH 4,80, produit P_2 titré, $S \ll K_m$

c pH 4,79, tampon acétate 32 mM, produit P_1 titré avec $S \gg K_m$

d pH 8,04, tampon Tris 0,028 M, produit P_1 titré, avec $S \gg K_m$

e rapport des constantes de vitesse de désacylation via l'alcool (k_4) et l'eau (k_3) suivant le nombre de carbone n de la chaîne aliphatique des alcools normaux primaires.

T A B L E A U N° 5

Effets comparés du méthanol et de l'isopropanol sur l'hydrolyse trypsique de substrats spécifiques (L BAEE, L LME) et non spécifiques (D BAEE, L TOME, L TME).

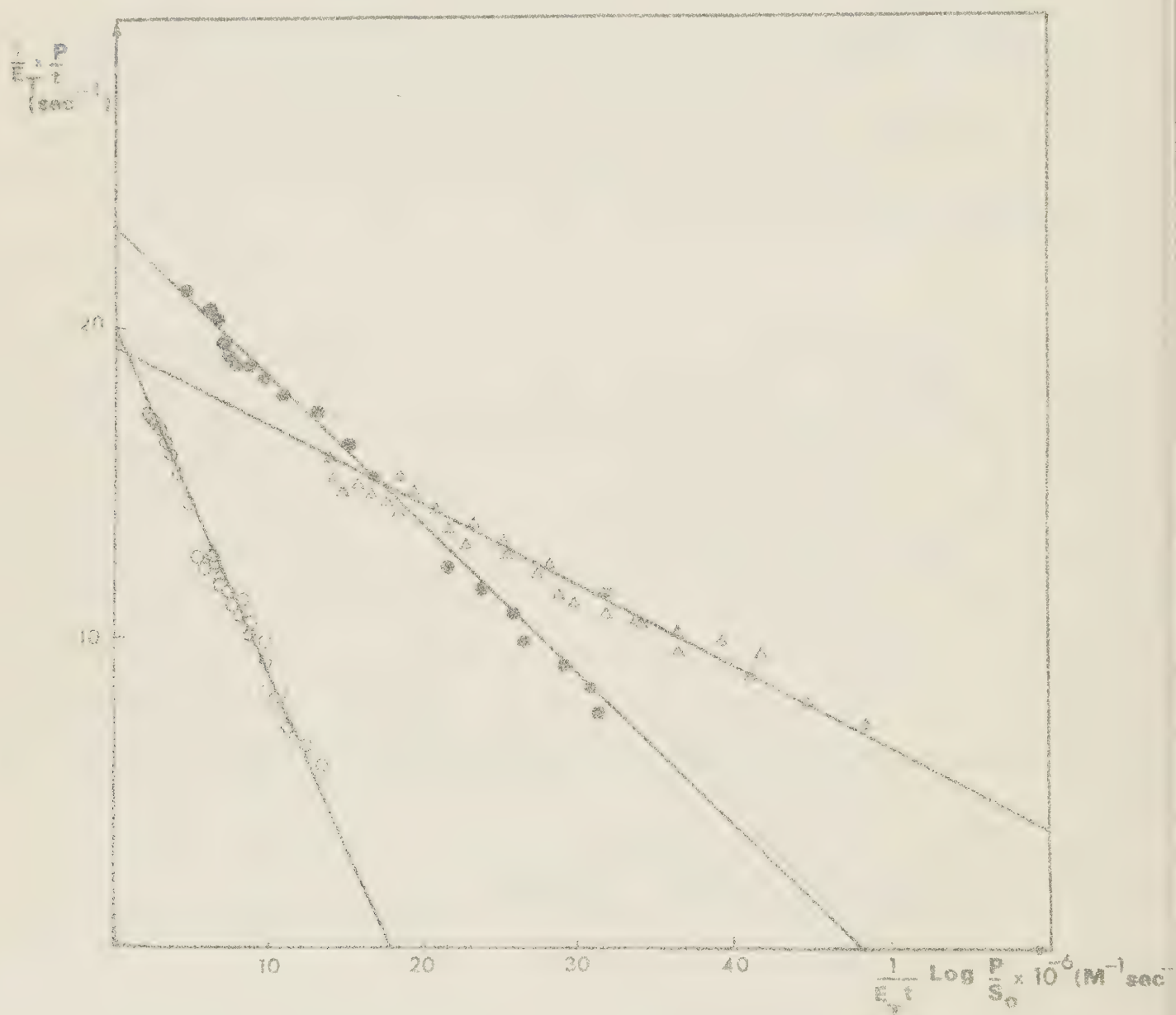
CaCl_2 0,025 M, 25° C : k_{cat_0} et K_{m_0} : paramètres de l'équation de Michaelis pour l'hydrolyse dans l'eau ; k_{cat} et K_m se rapportent à l'hydrolyse en présence de méthanol 2 M et $k_{\text{cat}'}$ et $K_{m'}$ à l'hydrolyse en présence d'isopropanol 0,6 M. Les erreurs standards de ces paramètres ou de leur rapport sont indiquées entre parenthèses, sauf dans le cas du L BAEE où elle n'ont pu être évaluées, étant donnée la représentation de Michaelis intégrée utilisée dans ce cas.

Substrat:	L BAEE ^{a,d}	D BAEE ^a	L LME ^b	L TME ^c	L TOME ^c
k_{cat_0} (sec ⁻¹)	19.45	.091 (.005)	30.50 (.60)	2.75 (.14)	5.37 (.11)
K_{m_0} (mM)	.0026	.74 (.08)	4.60 (.31)	40.50 (4.20)	15.80 (.70)
$k_{\text{cat}}/k_{\text{cat}_0}$	1.02	.50 (.04)	.90 (.03)	.24 (.03)	.16 (.01)
$k_{\text{cat}'}/k_{\text{cat}_0}$	1.19	.89 (.07)	.91 (.03)	.85 (.07)	.89 (.04)
K_m/K_{m_0}	4.29	2.20 (.42)	4.93 (.47)	1.27 (.31)	1.61 (.22)
$K_{m'}/K_{m_0}$	1.85	1.45 (.24)	1.03 (.10)	1.13 (.20)	.78 (.06)

a : pH 8,0 ; b : pH 5,8 ; c : pH 7,0.

d : Tris 0,032 M.

Figure 7 - Effets comparés du méthanol 2 M (○) et de l'isopropanol 0,6 M (●) par rapport à l'eau (Δ) sur l'hydrolyse trypsique du L. RAEE. Représentation de Michaelis intégrée. Conditions, voir tableau 5.



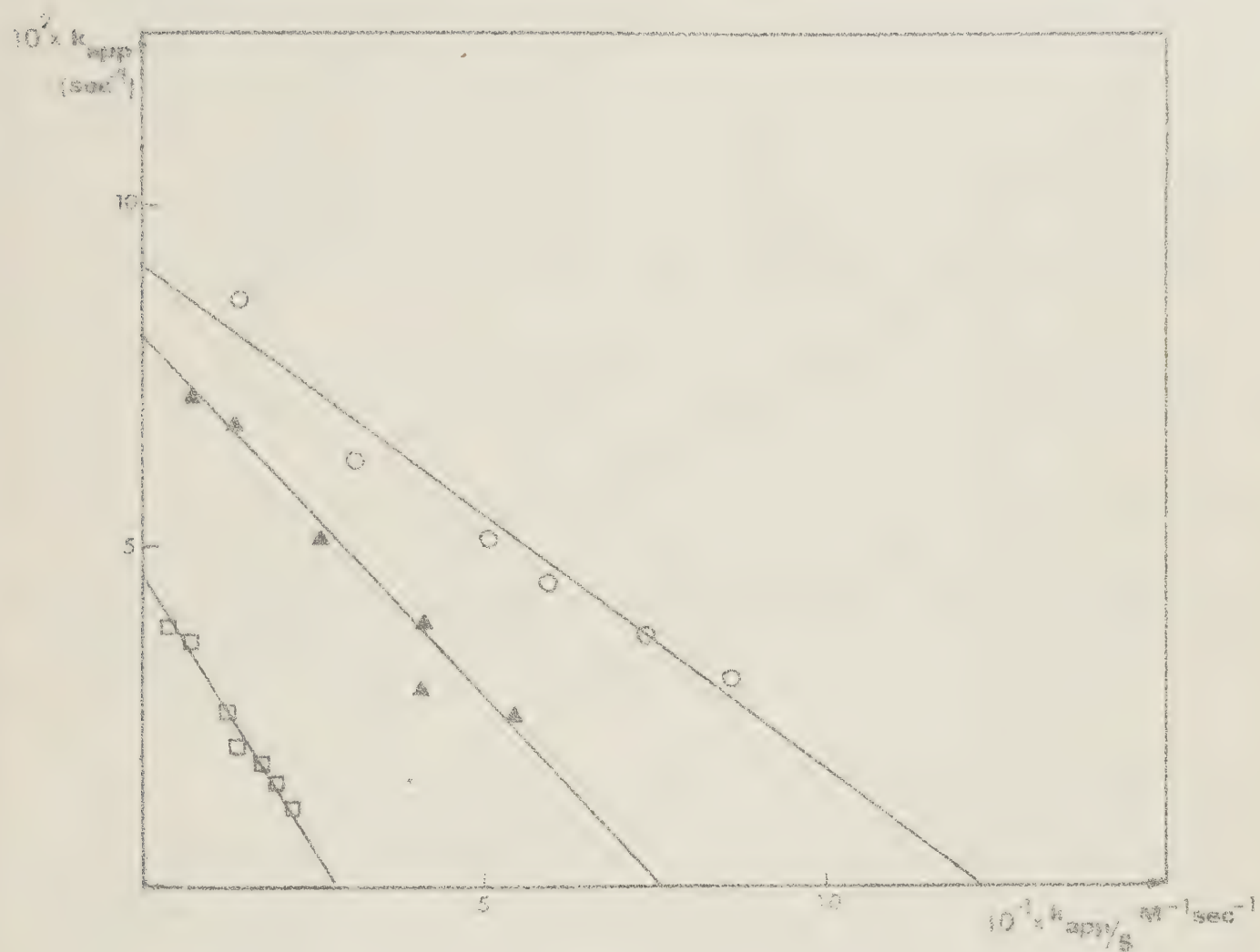
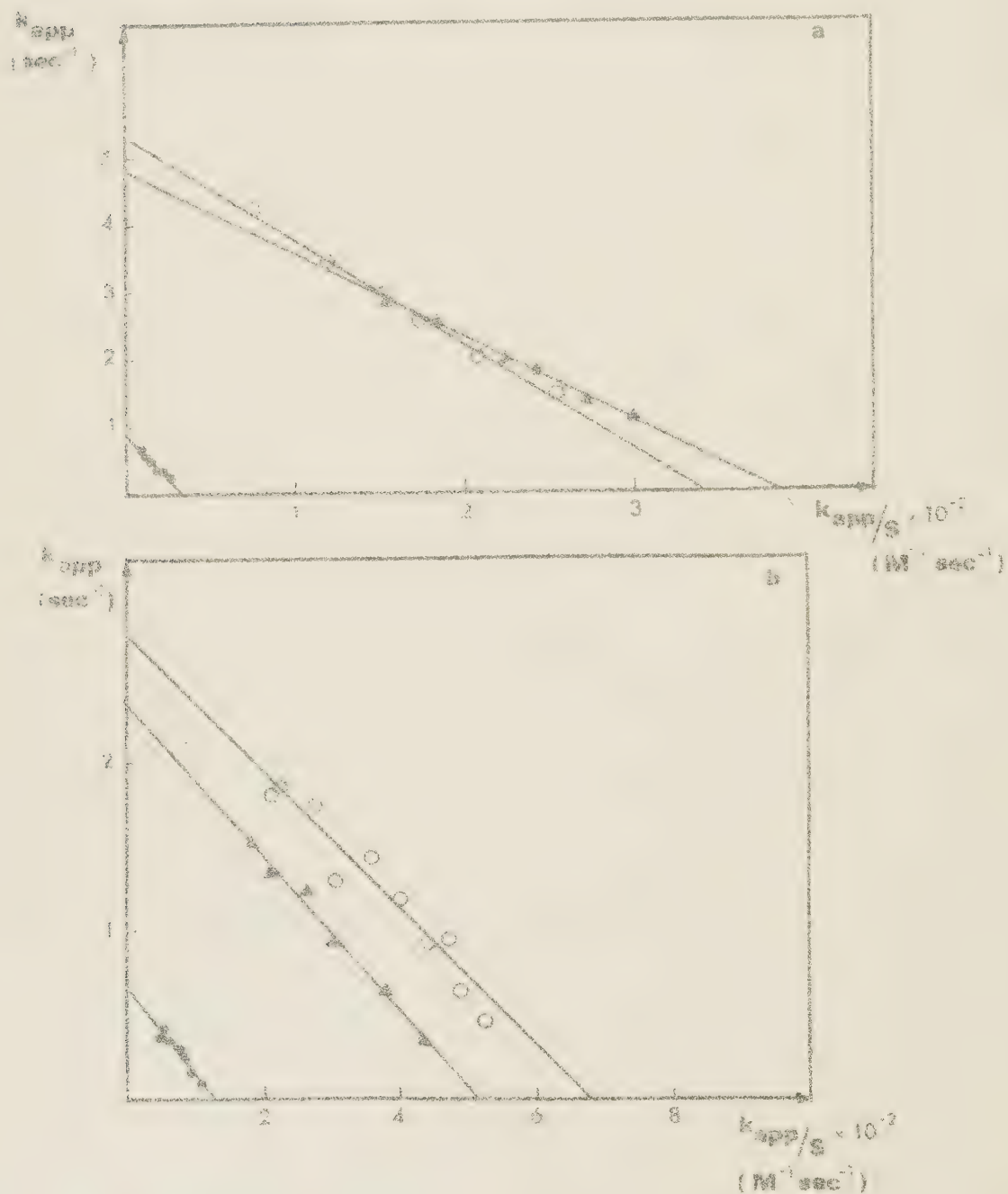


Figure 6 - Effets comparés du méthanol 2 M (□) et de l'isopropanol 0,6 M (▲) par rapport à l'eau (O) sur l'hydrolyse trypsique du D BAEE. Représentation d'Eadie. Conditions : voir tableau 5.

Fig. 9 - Effets comparés du méthanol 2 M (●) et de l'isopropanol (▲) par rapport à l'eau (O) sur l'hydrolyse trypsique de la α -NAP et de la TME (b). Représentation d'Eadie. Conditions : voir Figure 1.



$$\frac{P_2}{E_T t} = k_{cat2} - \frac{1}{E_T t} \log \frac{P_2}{S_0} \quad \text{Eq. (75)}$$

pour plusieurs cinétiques réalisées à différentes concentrations de substrat voisines de K_m . Comme on peut le constater sur la figure 7, la linéarité est acceptable ce qui indique que le BAME formé par transestérification (produit P_3) (18-19) a un K_m très voisin de celui du BAEE, l'évaluation de K_m au moyen des vitesses initiales donnant sensiblement la même valeur que celle donnée dans le tableau 5.

On peut remarquer d'ailleurs que la valeur de k_{cat2} pour le L BAEE qui y figure est sensiblement inférieure à celle donnée dans le chapitre précédent et évaluée au moyen de la méthode potentiométrique à pH constant. Nous pensons que cette différence peut être due à une adsorption de l'enzyme sur les parois de quartz de la cuve utilisée dans la méthode spectrophotométrique (20).

Les valeurs de pH auxquelles ont été effectuées les mesures correspondent au maximum d'activité de l'enzyme pour chaque substrat sauf dans le cas de la TOME, pour laquelle la lactamisation, catalysée par les ions OH^- (21), est négligeable à pH 7 (22), d'où le choix de ce pH.

Il apparaît clairement que la variation de k_{cat2} est fortement abaissée en présence de méthanol pour les 3 substrats non spécifiques (D BAEE, L TME, L TOME) ce qui implique que : $k_2 < k_3 \sim k_4N$ dans l'équation (72). L'effet observé est bien dû à la compétition nucléophile comme en témoignent les faibles effets sur k_{cat2} observés en présence d'isopropanol. Par contre le cas des substrats spécifiques, correspond au cas I P_2 , c'est-à-dire : $k_3 \ll k_2$, le méthanol n'ayant pratiquement pas d'effet sur le paramètre k_{cat2} mais augmentant la valeur de K_m conformément à la théorie.

Il est vraisemblable que les effets de solvant sur l'activité de la tryp-sine ne peuvent se ramener uniquement à des effets de constante diélectrique globale, si on considère les effets variables de l'isopropanol sur le K_m et k_{cat2} des 5 substrats testés, mais ces effets sont faibles et peuvent être négligés en première analyse. Dans le cas du D BAEE, étant donné que l'on observe une augmentation notable du K_m dans le méthanol par rapport à la valeur trouvée dans l'isopropanol, en même temps qu'une diminution de k_{cat2} , on se trouve dans le cas III P_2 , c'est-à-dire que $k_2 \approx k_3$, et il est alors possible de calculer les valeurs des paramètres k_2 , k_3 et K_S du schéma 4. A partir des données du tableau 5 pour une seule concentration de méthanol on obtient $k_2 = 0,31 \text{ sec}^{-1}$, $k_3 = 0,13 \text{ sec}^{-1}$ et $K_S = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. En étudiant la variation de k_{app2} en fonction du rapport méthanol-eau N/W à deux concentrations différentes de substrat ($S = 10^{-4} \text{ M} < K_m$ et $S = 10^{-2} \text{ M} > K_m$) on obtient une représentation linéaire conformément à la théorie (figure 10) et à partir des pentes ainsi obtenues on calcule : $k_3 = 0,15 \text{ sec}^{-1}$, $k_2 = 0,24 \text{ sec}^{-1}$ et $K_S = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: l'écart entre ces deux séries de valeurs donne une idée de la précision de ces évaluations qui peut être considérée comme satisfaisante, étant donné la difficulté d'évaluer quantitativement la contribution des effets de solvant à l'effet globalement observé.

Les variations de K_m observées dans le méthanol pour la TOME et la TME par rapport à celles dans l'isopropanol ne nous semblent pas très significatives : pour ces 2 substrats on se rapproche très certainement du cas limite II P₂ pour lequel $k_2 \ll k_3$. La valeur obtenue pour le K_m de la TOME dans l'eau est en excellent accord avec celle reportée par Elmore dans des conditions voisines des nôtres (22).

La conclusion immédiate de ce travail est que le rapport k_2/k_3 est fortement diminué lorsqu'on passe des substrats spécifiques à des substrats non spécifiques^a.

III. INFLUENCE DE LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE HYDROCARBONÉE DE L'ALCOOL SUR SA REACTIVITE APPARENTE.

Nous avons montré précédemment que l'augmentation du rapport k_4/k_3 en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée d'alcools aliphatiques normaux primaires pouvait s'interpréter sur la base d'interactions hydrophobes entre l'alcool et un site apolaire de l'enzyme (17). L'effet de chaîne observé sur trois acyltrypsines spécifiques a été également trouvé pour des acyltrypsines non spécifiques comme en témoignent les valeurs de k_4/k_3 pour différents alcools données dans le tableau 4. Les variations des valeurs de k_4/k_3 d'un substrat à l'autre peuvent être dues à des effets de solvant et l'effet de chaîne observé est sensiblement le même quel que soit le substrat. L'existence d'un site hydrophobe récepteur de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool impliqué dans l'étape de désacylation est à rapprocher des effets d'activation par le substrat (23,24) et d'inhibition non compétitive (25) dans la mesure où elle révèle l'existence de subsites au voisinage immédiat du centre actif de l'enzyme. La variation du rapport k_4/k_3 dans une série d' ω diols $\text{HO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{n-2}\text{-CH}_2\text{-OH}$ donnée dans la fig. 11

indique que dans ces cas l'interaction acylenzyme-alcool est limitée à $\text{-CH}_2\text{-}$ et que pour $n > 10$, la taille de l'alcool empêche sa participation à la désacylation par suite vraisemblablement d'effets stériques (le rapport k_4/k_3 a été trouvé < 1 pour le 1-10 décanediol et la LME).

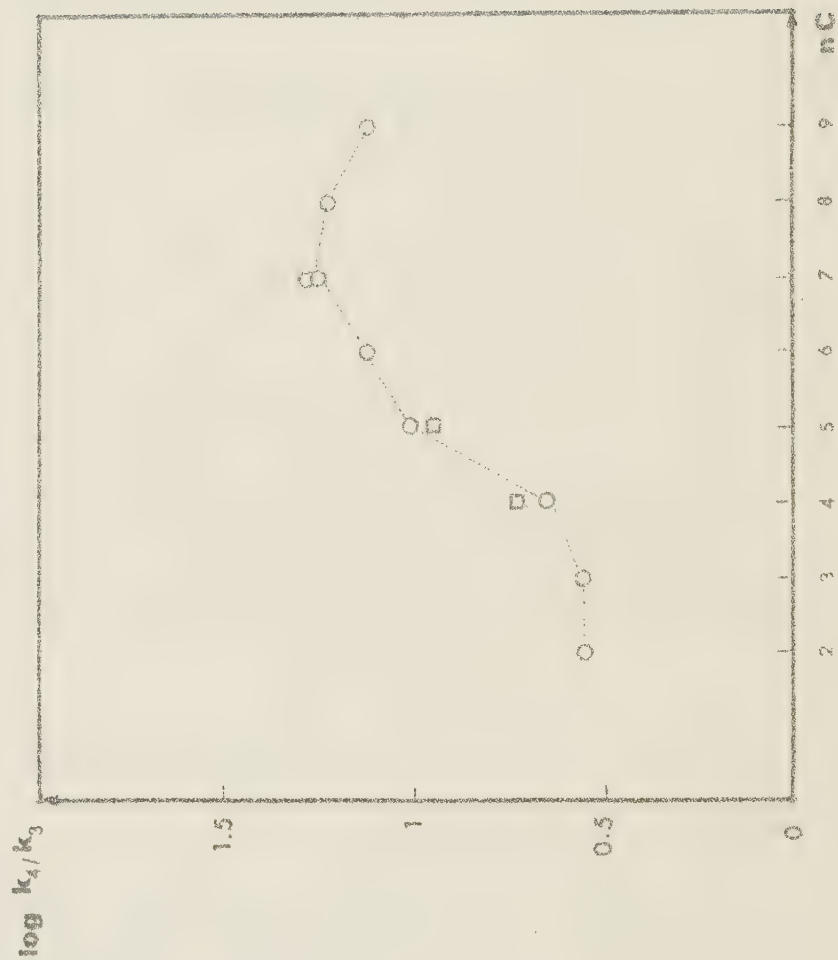
Un résultat intéressant a été observé en présence de benzamidine, inhibiteur compétitif des substrats spécifiques, qui inhibe non compétitivement la pentanolyse de la CLPNE sans avoir d'effet sur l'hydrolyse ou la méthanololyse du même substrat, hormis bien entendu l'inhibition compétitive. Ceci peut indiquer un recouvrement du site récepteur de l'alcool et d'un site secondaire de fixation de la benzamidine caractérisé par une affinité environ 1000 fois plus faible que

^aTous les substrats utilisés dans cette partie présentent un caractère cationique (partiel dans le cas de TME, voir chapitre III). Dans le cas des substrats neutres, il est en effet extrêmement difficile de déterminer k_{cat} et K_m étant donné la faible solubilité de ces substrats. Cependant, dans les cas de l'APAME, pour $5.10^{-3} \leq S \leq 4.10^{-2}$ on trouve $k_{\text{cat}2} = 53 \pm 3,1 \text{ sec}^{-1}$ et $K_m = 0,12 \pm 0,01 \text{ M}$ dans l'eau et $k_{\text{cat}} = 11 \pm 2 \text{ sec}^{-1}$ et $K_m = 0,11 \pm 0,02 \text{ M}$ dans le méthanol 2 M, ce qui semble indiquer que pour ce substrat $k_3 \gg k_2$ conformément à une discussion antérieure (14).

Figure 11 - Effet de ω diols $\text{HOC(CH}_2\text{)}_{n-2}\text{CH}_2\text{OH}$ sur l'hydrolyse enzymatique de substrats suédois. Rapport k_4/k_3 en fonction du nombre de carbones n de la chaîne aliphatique des ω diols.

O LME : pH 4,8, CaCl_2 0,025 M, Produit P₂ filtré ($k < k_m$)

□ CLPME : pH 4,73, tampon acétate 0,032 M, CaCl_2 0,025 M, Produit P₂ filtré ($0 > k_m$)



celle du site principal responsable de l'inhibition compétitive et cet effet doit être rapproché des effets de solvant observés sur l'alcoolyse des acyl-trypsines spécifiques qui indiquent une diminution du rapport k_4/k_3 des alcools supérieurs en présence de solvants comme la diméthylformamide.

IV - DISCUSSION DES RESULTATS DE LA COMPETITION NUCLEOPHILE.

Le résultat le plus important obtenu dans ce chapitre est que la constante k_2 diminue beaucoup plus que la constante k_3 lorsqu'on passe d'un substrat spécifique à un substrat non spécifique. Par exemple, si on prend pour le L BAEE, $K_s = 2,4 \cdot 10^{-3}$ M, valeur obtenue pour le L BAA (26) et très voisine de celle obtenue pour le D BAEE, on obtient pour le rapport k_2/k_3 de ce substrat une valeur de l'ordre de 920^a, soit $2,1 \cdot 10^4 \text{ sec}^{-1}$ pour la constante d'acylation k_2 . Bernhard et Gutfreund, par l'observation directe de l'étape d'acylation utilisant une technique rapide, donnent $k_2 = 1,5 \cdot 10^4$ en bon accord avec la valeur précédente^b (31). Or, dans le cas du D BAEE, on trouve k_2 de l'ordre de 0,3 sec^{-1} seulement, soit une diminution considérable par rapport au L BAEE.

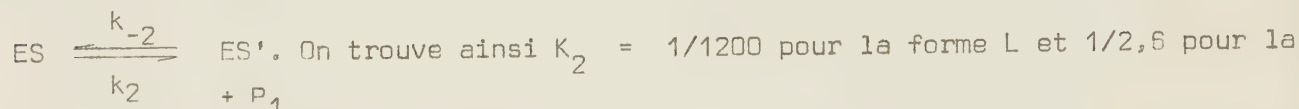
La stéréospécificité de la trypsine se traduit donc ici par une diminution d'un facteur $7 \cdot 10^4$ pour l'étape d'acylation contre seulement un facteur $1,5 \cdot 10^2$ pour l'étape de désacylation (k_3), et sans aucune modification de la constante de dissociation K_s du complexe d'adsorption enzyme substrat ! Des conclusions analogues peuvent être tirées des résultats obtenus avec la TME (par rapport à la LME) et la TOME. Ainsi la trypsine exerce essentiellement sa spécificité au niveau de l'étape d'acylation, à la différence de la chymotrypsine si l'on se réfère aux résultats de Knowles (27,1).

On peut interpréter ce résultat en admettant des fixations non productives au niveau du complexe de Michaelis formé avec les substrats non spécifiques (voir première partie), mais de tels effets ne semblent pas pouvoir expliquer le facteur 500 qui différencie la stéréospécificité de la trypsine au niveau des étapes d'acylation et de désacylation pour le L et le D BAEE, et le fait que les valeurs de K_s sont très voisines pour les 2 substrats, ce qui entraînerait pour le K_s "productif" du D BAEE une valeur de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3} \times 2 \cdot 10^4 / 0,3 \neq 133$! Par ailleurs un début d'explication peut être fourni en évaluant la variation d'enthalpie libre qui accompagne la formation de l'acyl enzyme à partir du complexe de Michaelis. Le rapport k_4/k_3 pour l'éthanol est respectivement égal à 0,76 et 0,80 pour la LME et l'APAME (cf. Tableau 4) ; on peut admettre que comme pour le méthanol, ce rapport est sensiblement le même pour le L et le D BAEE. Comme alors k_4 peut être identifié à la constante inverse d'acylation k_{-2} (éthanol, lyse de l'acyl-enzyme redonnant le substrat initial), on peut ainsi calculer le rapport k_{-2}/k_2 pour les

^aRécemment Himoe a rapporté une valeur du rapport k_2/k_3 pour le TSAME de 800, donc très proche de celle-ci. (Himoe, communication personnelle).

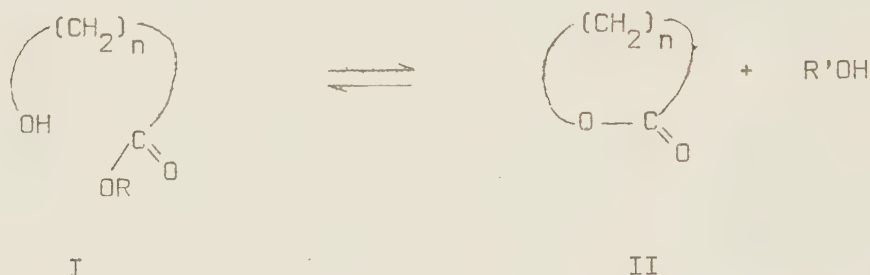
^bIl nous semble cependant honnête de souligner que l'accord entre ces 2 estimations est probablement fortuit, étant donné les approximations effectuées dans les deux cas. Cependant il indique que l'ordre de grandeur donné pour k_2 est certainement correct.

L et D BAEE, rapport qui correspond à la constante d'équilibre K_2 de la réaction



forme D, ce qui correspond respectivement à une variation d'enthalpie libre de - 4,2 Kcal et de - 0,58 Kcal lorsqu'on passe du complexe de Michaelis à l'acyl-enzyme.

La formation de ES' à partir de ES n'est rien d'autre qu'une réaction de transestérification sur le plan purement chimique (28), on peut par exemple la comparer à la formation d'une lactone à partir d'un ester ω hydroxylé suivant la réaction :



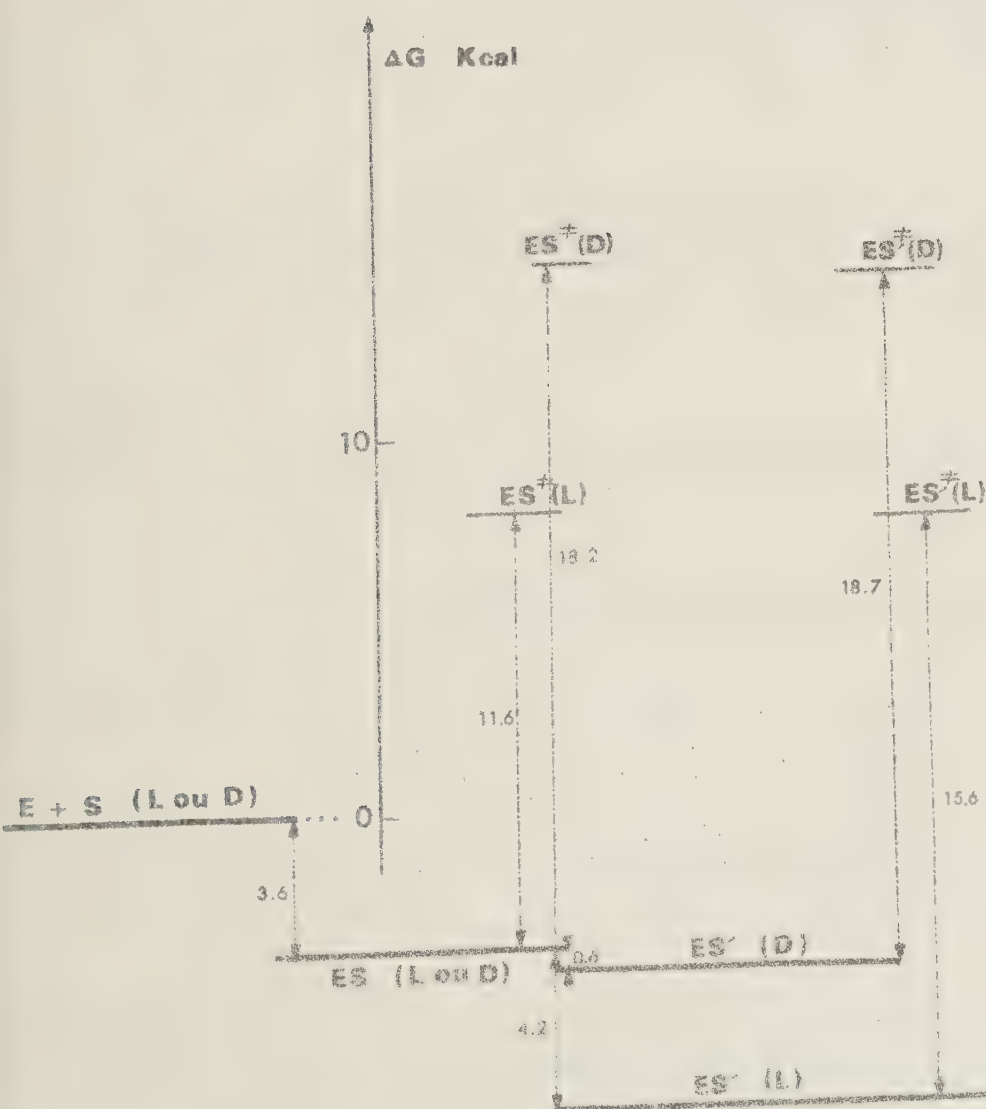
Or dans le cas de la γ butyrolactone (29), le passage de I à II se traduit par une diminution d'enthalpie libre de l'ordre de 1 Kcal, comparable donc à celle observée avec le D BAEE mais très inférieure à celle du L BAEE.

Ceci peut s'expliquer en admettant que l'énergie des interactions non covalentes enzyme-substrat varie d'un complexe à l'autre. Les formes L et D seraient fixées sur l'enzyme au niveau du complexe de Michaelis dans un état contraint préfigurant dans le cas du dérivé L l'état de transition correspondant à l'étape d'acylation (k_2), d'où un abaissement considérable de sa barrière d'activation. Dans le cas du dérivé D par contre, la distorsion induite par l'enzyme ne serait pas favorable sur le plan de la catalyse par suite de son orientation impropre par rapport aux entités catalytiques. Ceci suppose que l'énergie d'interaction potentielle de ces substrats avec l'enzyme soit considérablement plus grande que la valeur observée : or comme l'a fait remarquer J.J. Béchet (15), l'affinité d'inhibiteurs isostériques pour l'enzyme est souvent plus forte que celle observée pour des substrats spécifiques.

On peut penser que cette distorsion du substrat agit essentiellement au niveau de sa liaison ester : à ce point de vue, Bernhard et Coles ont suggéré un blocage de la liaison ester dans une configuration cis dans le cas de mono β acryloyl chymotrypsines (34). Comme sur la base d'un enzyme rigide on voit mal comment cette distorsion pourrait également s'effectuer au niveau du substrat D^a, il est possible qu'elle soit due à une série d'effets réciproques enzyme-substrat

^aIl est nécessaire de postuler une distorsion du substrat D, étant donné les valeurs voisines de K_3 pour les formes L et D, si on admet une potentialité d'interaction identique pour ces deux formes.

Figure 12 - Diagramme Énergétique de l'hydrolyse triphosphorique comparée des L et D BAEE. L'indice : # se réfère aux complexes actifs formés à partir des complexes ES (complexe de Michaelis) et ES' (acylenzyme). Les valeurs des paramètres thermodynamiques d'activation et d'équilibre sont calculées à partir des valeurs des constantes cinétiques pour le L et le D BAEE données dans le texte.



impliquant donc un changement de conformation du centre actif.

L'acylation de l'enzyme impliquant nécessairement une modification de l'orientation de la liaison ester formée avec la sérine par rapport à celle de la liaison ester initiale dans ES, on conçoit que l'effet de distorsion soit considérablement atténué au niveau de l'acylenzyme formée avec le L BAEE, d'où la stabilisation observée de ES' par rapport à ES, et l'augmentation d'enthalpie libre d'activation de l'étape de désacylation par rapport à l'étape d'acylation qui est justement de l'ordre de 4 Kcal.

Dans le cas du dérivé D par contre, la distorsion s'exercerait toujours sur le substrat au niveau de l'acylenzyme étant donné sa configuration impropre. Cette interprétation est illustrée par le diagramme énergétique de la figure 12 : elle va dans le sens de la discussion générale de Jencks (33) sur le rôle des effets de distorsion (strain) dans la catalyse enzymatique.

On peut également interpréter ces résultats en admettant qu'il existe un changement de conformation de l'enzyme lorsqu'on passe de ES à ES' et que ce changement de conformation en présence de substrat correspond à un gain d'enthalpie libre avec la forme L du substrat, à la différence de la forme D, peut-être en raison de la formation de liaisons de compensation (30) dans l'enzyme dans le premier cas.

On ne saurait nier le caractère hautement spéculatif de ces interprétations mais il est bien évident qu'un facteur spécifique de l'action enzymatique intervient dans ce phénomène. Il serait intéressant de confirmer le diagramme énergétique de la figure 12 au moyen d'une observation directe des étapes d'acylation et de désacylation par une technique de stopped flow analogue à celle décrite par Bernhard (31,32).

Un effet analogue a été observé par Wilson dans le cas de la phosphatase alcaline, le phosphorylenzyme formé (phosphorylsérine) étant beaucoup plus stable que le complexe d'adsorption formé par l'enzyme avec le phosphorylester-substrat (35).

Quoiqu'il en soit, les résultats de la compétition nucléophile nous permettent de formuler une règle qui sera très utilisée par la suite :

Les esters spécifiques de la trypsine sont caractérisés par une étape de désacylation limitante alors que les esters non spécifiques formés à partir d'autres aminoacides que la lysine et l'arginine sont caractérisés par une étape d'acylation limitante, à l'exception des paranitrophénylesters.

Ceci est confirmé par le fait que les esters méthylique, benzylique et paranitrophénolique de la carbobenzoxylysine (36) sont hydrolysés à la même vitesse maximum par la trypsine, alors que celle-ci hydrolyse l'AGPNE environ 16 fois plus rapidement que l'AGEE à saturation en substrat (voir chapitre IV).

Il convient pour terminer ce chapitre de souligner que les équations 71 à 74 semblent être vérifiées dans le cas de la β galactosidase^a, ce qui suggère que le mécanisme d'action de cet enzyme en présence d'alcools est correctement décrit par le schéma cinétique 4, l'intermédiaire pouvant être dans ce cas un galactosylenzyme.

^aO. Viratelle et J.P. Tenu, communication personnelle.

CHAPITRE III

ANALYSE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DES DERIVES DE LA LYSINE NON PROTEGES SUR LEUR GROUPEMENT α AMINE^a

Les esters dérivés de la lysine sont de "bons substrats" de la trypsine (4). L'analyse cinétique de la compétition nucléophile au cours de l'hydrolyse trypsique de la LME et de la LEE a été effectuée précédemment à pH 4,8 et 25° (14). Dans ces conditions, il apparaît que le rapport k_2/k_3 est de 5 environ dans le cas de la LME. A pH 5,8 nous n'observons plus d'effet notable du méthanol sur le paramètre k_{cat} d'hydrolyse trypsique de la LME (voir tableau 5, Chapitre II et Figure 13), ce qui indique que k_2 est très supérieur à k_3 à ce pH (cas I P₂, $k_2 \gg 20 k_3$) à la différence de l'effet observé à pH 4,8.

Dans le but de lever cette ambiguïté et de préciser un éventuel effet de l'état d'ionisation du groupement α NH₂ de ce substrat sur les caractéristiques cinétiques de son hydrolyse, nous avons entrepris l'étude de l'effet du pH sur les paramètres k_{cat} et K_m de la LME.

a) Résultats expérimentaux avec la LME.

Les esters dérivés de la lysine peuvent se présenter dans la zone d'activité trypsique en fonction du pH sous deux formes I et II selon l'état d'ionisation de leur groupement α NH₂ suivant l'équilibre :



Pour la LME nous avons trouvé, à 25°, CaCl₂ 0,025 M $\text{p}K_{oa} = 7,28 \pm 0,05$, le $\text{p}K$ du groupement αNH_2 étant de 9,15 pour la lysine (produit P₂) (37). Ceci implique que le nombre de protons libérés par mole d'ester hydrolysée soit inférieur à 1 au voisinage de pH 7. La figure 14 montre que le nombre de protons libérés par hydrolyse trypsique complète de la LME (10⁻² M, CaCl₂ 0,025 M, 25°) en fonction du pH est en bon accord avec les valeurs calculées (voir tableau 6) à partir de la fonction :

$$f_c = 1 + \frac{1}{1 + \frac{K_{oa}}{H}} - \frac{1}{1 + \frac{K_{oa}'}{H}} \quad (76)$$

avec $\text{p}K_{oa} = 7,28$ et $\text{p}K_{oa}' = 9,15$, ces $\text{p}K$ étant respectivement celui du groupement αNH_2 de l'ester et celui de la lysine (produit P₂ titré).

^aCette étude a bénéficié de la collaboration de J.C. Devaux, stagiaire de la D. G. R. S. T..

Figure 13 - Effets comparés du méthanol 2 M ($\square$) et de l'isopropanol 1,6 M (Δ) sur l'hydrolyse trypsique de la LME par rapport à l'eau ($\circ$).
Conditions : 25°, CaCl_2 0.025 M, produit P_2 titré, a) pH 4,8, b) pH 5,8.
représentation d'Arrhenius.

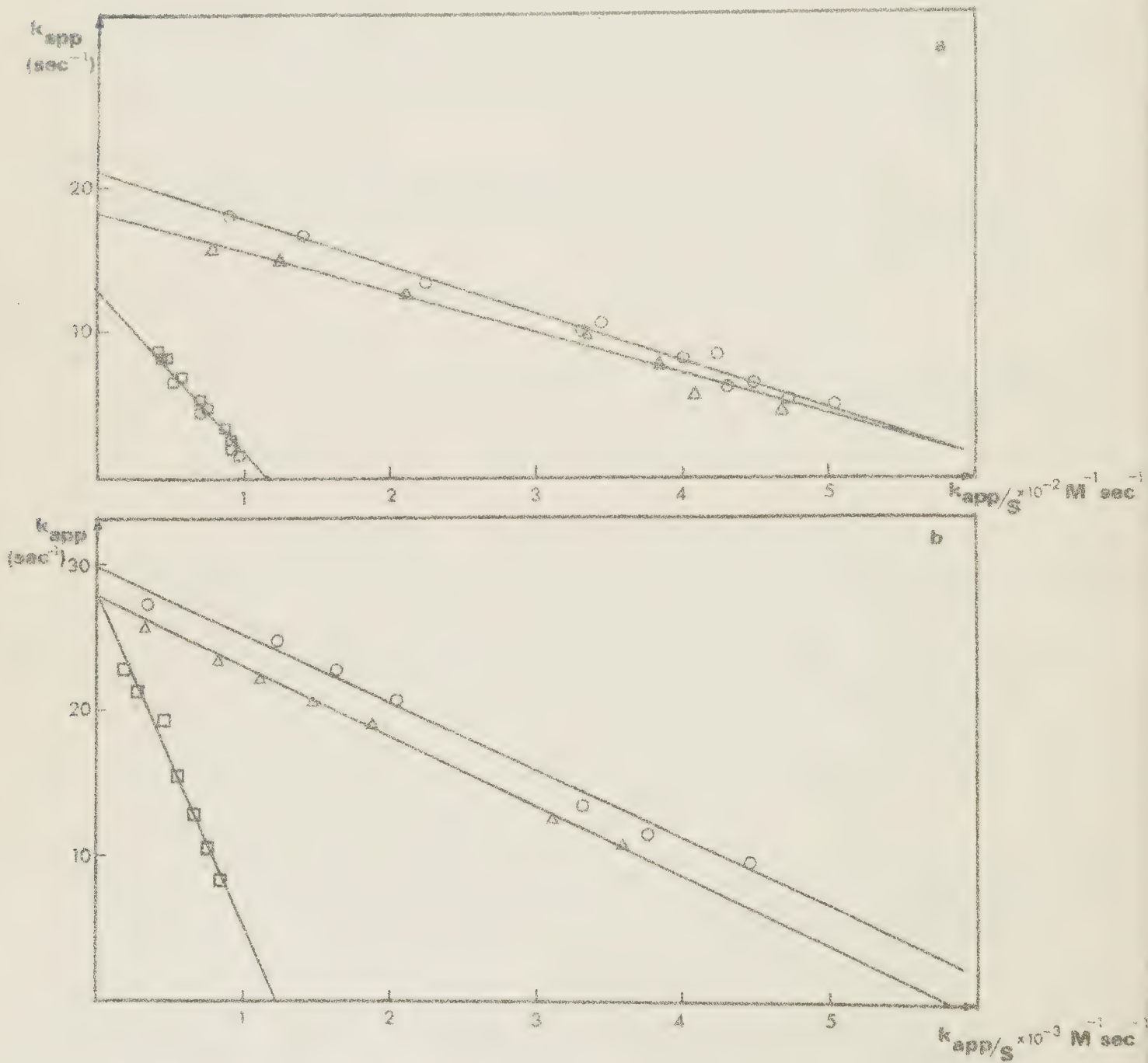


Figure 14 - Nombre de protons f_c titrés par mole de LME hydrolysée en fonction du temps. Les points sont expérimentaux, la courbe est calculée à partir de l'équation 76 et des valeurs données dans le texte.

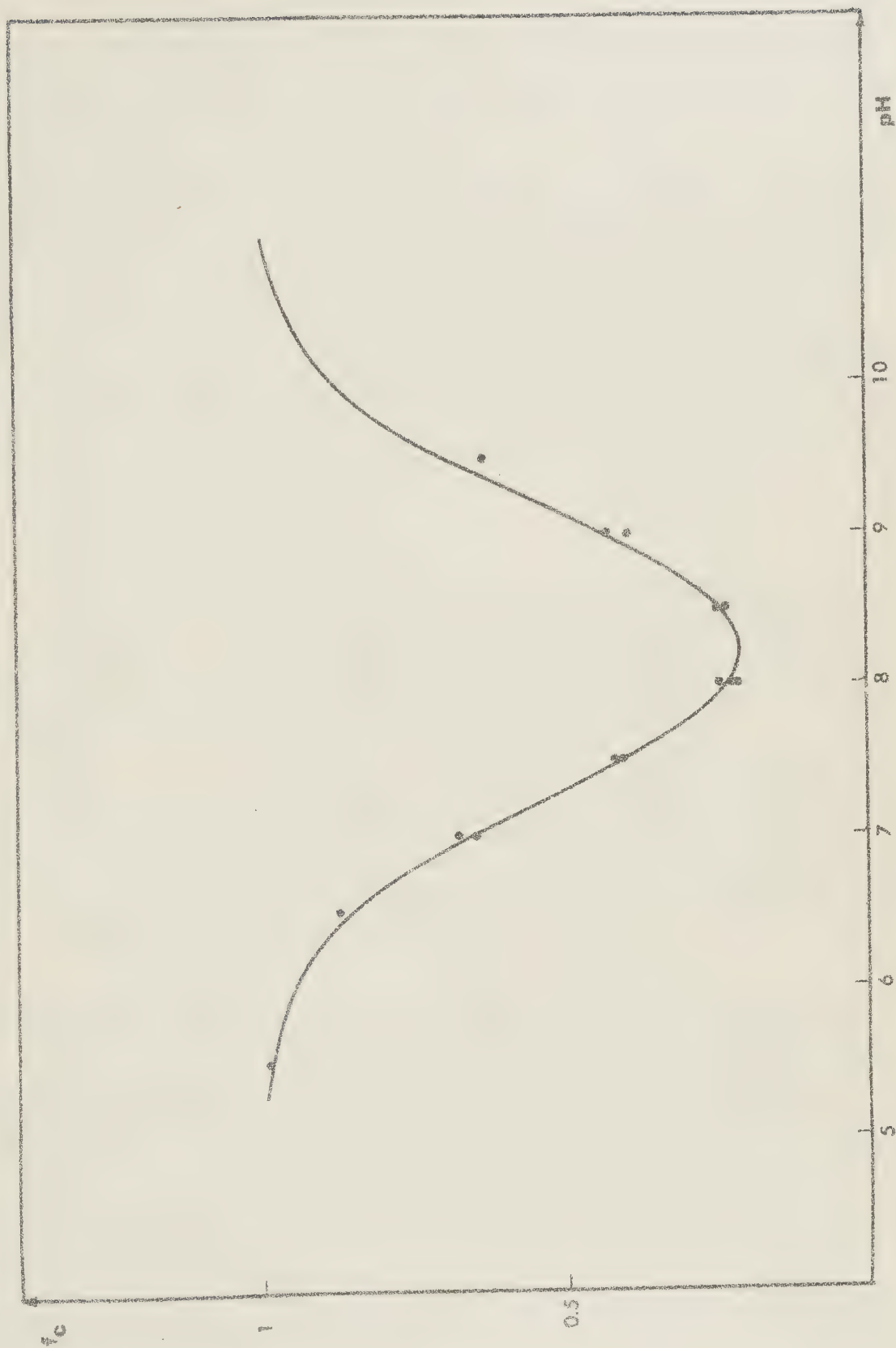


TABLEAU N° 6

Valeurs du facteur correctif f_c en fonction du pH pour la LME, CaCl_2 0,025 M, 25°C.

pH	a	b
	f_c exp.	f_c calc.
5.50	.98	.99
6.50	.89	.86
7.00	.68	.66
7.50	.41	.40
8.00	.226	.226
8.50	.243	.238
9.00	.41	.43
9.50	.63	.69

• Moyenne d'au moins 2 valeurs (sauf à pH 9,5) obtenue par hydrolyse trypsique complète de la LME 10^{-2} M, au pH indiqué.

• Valeurs calculées au moyen de l'équation 76 avec $\text{pK}_{\text{oa}} = 7,28$ et $\text{pK}'_{\text{oa}} = 9,15$.

Ceci révèle également que la formation d'éventuels produits de trans-peptidation (38) ne modifie pas sensiblement le nombre de protons titrés, ce qui peut indiquer que ces effets sont peu importants dans ce cas, comme Niemann l'a montré avec la chymotrypsine (39).

L'analyse des paramètres k_{cat} , k_{cat}/K_m et K_m en fonction du pH révèle des profils^a (55) très différents de ceux obtenus avec les substrats protégés en α (figures 15,16 ; tableau 7). Les valeurs de k_{cat} ont été corrigées en utilisant les valeurs expérimentales du coefficient f_c données dans le tableau 6. Les mesures ont été effectuées en titrant le produit P₂ (lysine) par la méthode potentiométrique à pH constante ou par la méthode balistique au-dessus de pH 7.

Les valeurs de k_{cat}/K_m ont été obtenues soit à partir des valeurs des paramètres k_{cat} et K_m évaluées au moyen du programme de calcul PS1a (non pondéré) ou directement par une représentation du 1er ordre avec $S \ll K_m$ pour pH > 6,5, ces dernières valeurs étant sans doute plus précises que les précédentes puisqu'il n'est plus nécessaire alors d'introduire de facteur correctif f_c et que les valeurs de K_m sont relativement faibles à ces pH.

b) Analyse des données cinétiques.

Le schéma cinétique le plus simple qui peut a priori décrire l'hydrolyse trypsique de substrats non protégés en α dérive du schéma 1 en considérant les 2 formes I et II du substrat et l'ionisation de l'histidine du centre actif, active sous sa forme déprotonée. Les constantes d'ionisation correspondant au substrat sont affectées de l'indice a et celles correspondant à l'enzyme de l'indice b. Ce schéma (schéma cinétique 5) est donné à la page suivante.

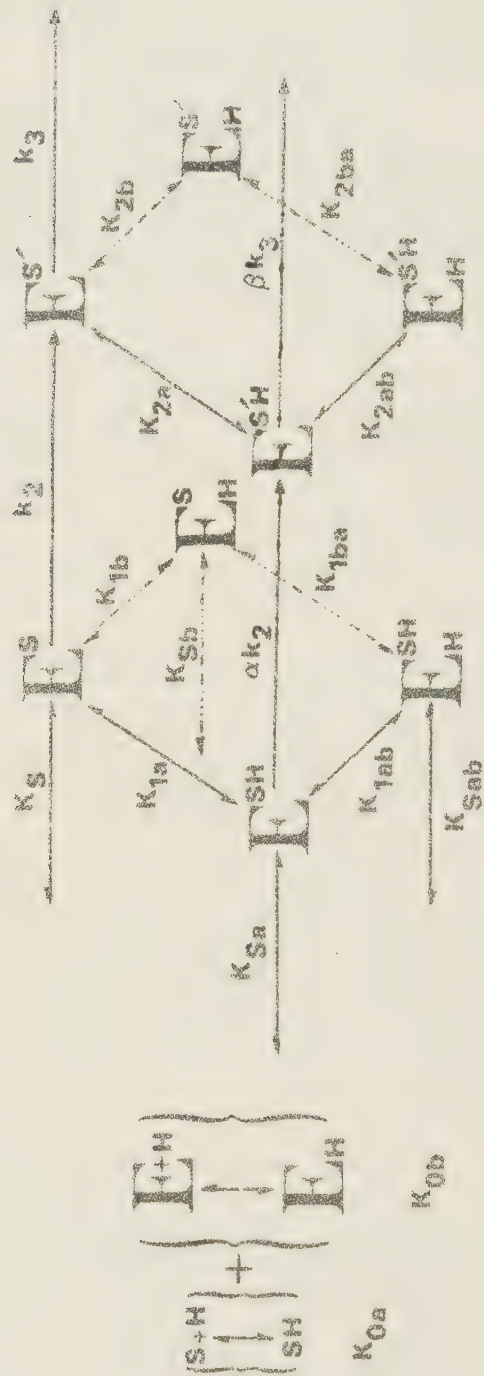
Les espèces actives susceptibles d'être transformées chimiquement sont ES et ESH au niveau du complexe de Michaelis et ES', ES'H au niveau de l'acylenzyme. Dans ce schéma figurent 14 constantes d'équilibre dont 9 sont indépendantes^b, en admettant que les étapes d'ionisation et d'adsorption des 2 formes du substrat sur l'enzyme sont très rapides devant les étapes d'acylation et de désacylation (quasi équilibre). A l'état stationnaire, l'équation de vitesse correspondante est michaelienne (éq. 3), avec :

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 \left(1 + \frac{\alpha H}{K_{1a}}\right) \left(1 + \frac{\beta H}{K_{2a}}\right)}{k_2 \left(1 + \frac{\alpha H}{K_{1a}}\right) \left[1 + H \left(\frac{1}{K_{2a}} + \frac{1}{K_{2b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{2a} K_{2ab}}\right)\right] + k_3 \left(1 + \frac{\beta H}{K_{2a}}\right) \left[1 + H \left(\frac{1}{K_{1a}} + \frac{1}{K_{1b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{1a} K_{1ab}}\right)\right]} \quad \text{Eq. (77)}$$

^a Une étude préliminaire avec la lysine paranitrophénylester donne un profil k_{cat} vs pH sensiblement identique à celui obtenu avec la LME dans la zone acide.

^b Nous avons choisi comme constantes indépendantes les constantes d'ionisation K_{oa} , K_{ob} , K_{1a} , K_{1b} , K_{1ab} , K_{2a} , K_{2b} et K_{2ab} et la constante de dissociation K_s du complexe de Michaelis ES.

Schéma cinétique 5 - Schéma cinétique décrivant l'hydrolyse typique de substrats non protégés par leur groupement α aminé (voir texte).



T A B L E A U . N ° . 7

Paramètres k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m d'hydrolyse trypsique de la LME en fonction du pH, à 25°, $CaCl_2$ 0,025 M. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses (programme de calcul PS1a non pondéré).

pH	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ sec ⁻¹)
4.00	2.68 (.08)	49.50 (4.20)	54
4.25	10.60 (.30)	74.00 (4.20)	145
4.50	13.55 (.32)	44.50 (2.20)	305
4.65	19.85 (.90)	45.00 (4.60)	440
4.80	21.05 (.30)	34.50 (1.10)	649
5.00	27.05 (.42)	24.20 (.90)	1140
5.20	28.70 (.42)	15.80 (.66)	1810
5.50	28.35 (.30)	8.05 (.25)	3550
5.80	30.50 (.60) ^a	4.60 (.31)	6550
6.00	22.05 (.28) ^a	3.15 (.08)	9220
6.50	24.80 (.47) ^a	1.20 (.08)	20650 19600 ^b
7.00	16.45 (.30) ^a	.51 (.03)	32500 32000 ^b
7.50	10.65 (.14) ^a	.37 (.02)	28500 42400 ^b
8.00	8.25 (.22) ^a	.30 (.03)	27500 35300 ^b
8.50	6.79 (.21) ^a	.26 (.03)	26250 29100 ^b

^a Ces valeurs sont corrigées en utilisant le facteur f_c défini dans le texte.

^b Valeurs obtenues à partir d'une représentation du premier ordre dans des conditions telles que $S \ll K_m$.

Figure 15 - Effet du pH sur le paramètre k_{cat} d'hydrolyse trypsique de la LME. La courbe est calculée (voir texte), les points sont expérimentaux. Conditions : voir tableau 7.

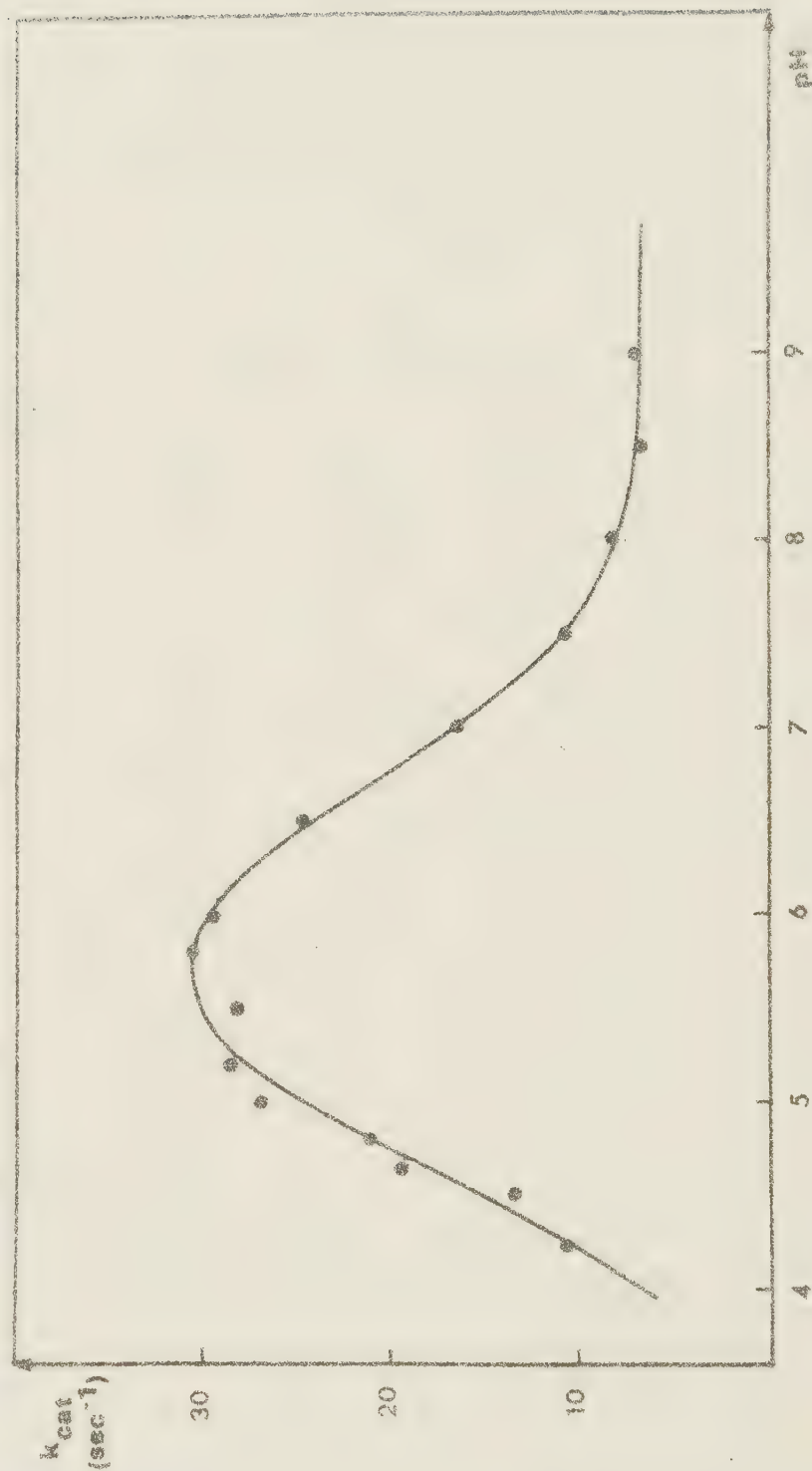
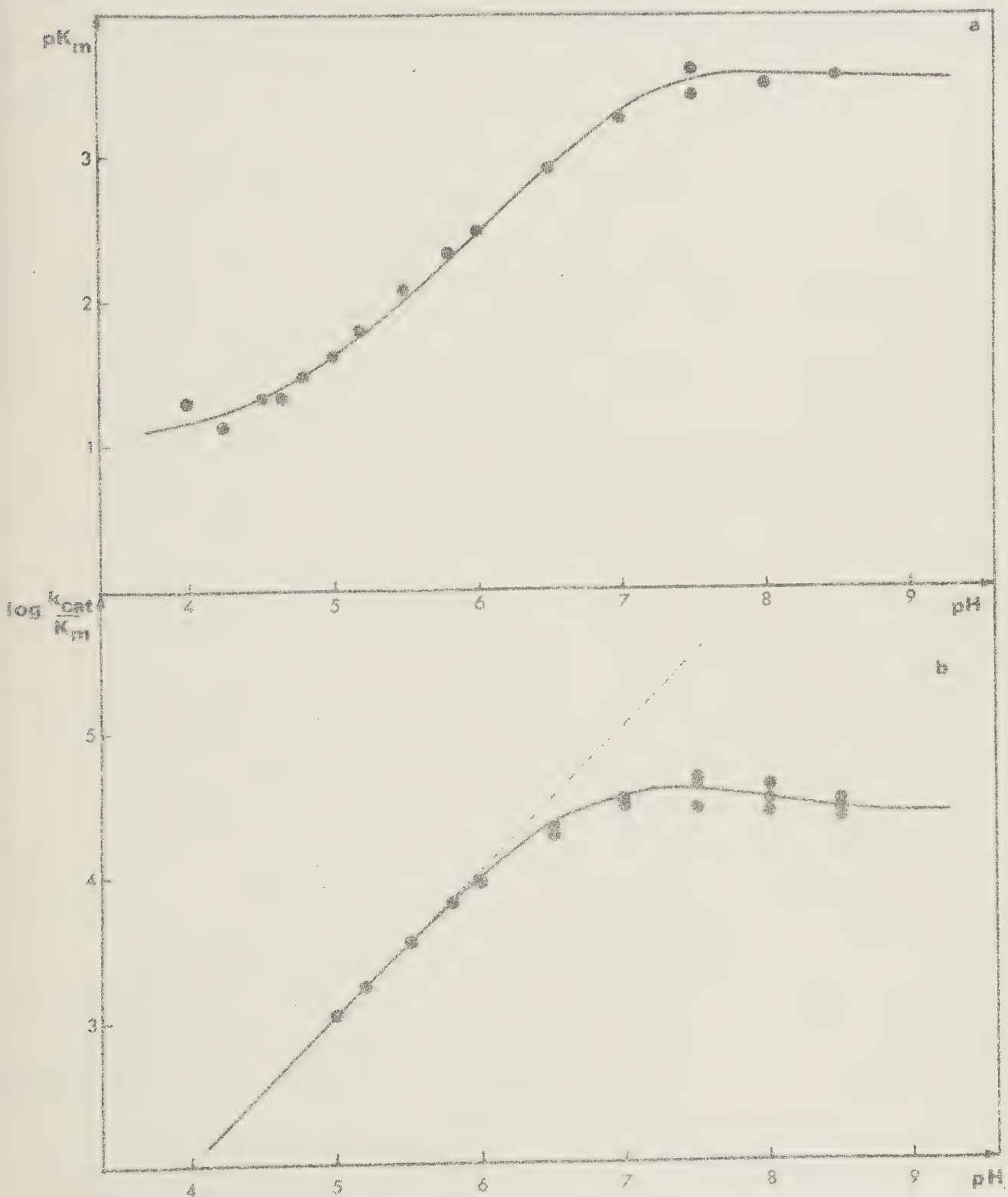


Figure 16 - Effet du pH sur les paramètres K_m (a) et k_{cat}/K_m (b) de la LME.

Les courbes sont calculées (voir texte), les points sont expérimentaux. Conditions : voir tableau 7.



$$K_m = K_s \frac{k'_3 \left(1 + \frac{\beta H}{K_{2a}}\right) \left(1 + \frac{H}{K_{oa}}\right) \left(1 + \frac{H}{K_{ob}}\right)}{k_2 \left(1 + \frac{\alpha H}{K_{1a}}\right) \left[1 + H \left(\frac{1}{K_{2a}} + \frac{1}{K_{2b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{2a} K_{2ab}}\right)\right] + k_3 \left(1 + \frac{\beta H}{K_{2a}}\right) \left[1 + H \left(\frac{1}{K_{1a}} + \frac{1}{K_{1b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{1a} K_{1ab}}\right)\right]} \quad \text{Eq. (78)}$$

Comme l'étape de désacylation est limitante pour la LME, il vient :

$$k_{cat} = \frac{k_3 \left(1 + \frac{H}{K_{2a}}\right)}{1 + H \left(\frac{1}{K_{2a}} + \frac{1}{K_{2b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{2a} K_{2ab}}\right)} \quad \text{Eq. (79)}$$

qui peut se mettre sous la forme (cf. équation correspondante du tableau 1) :

$$y = a \frac{1 + bx}{1 + cx + dx^2} \quad \text{Eq. (80)}$$

avec : $y = k_{cat}$, $a = k_3 = k_{cat_0}$, $b = \beta/K_{2a}$, $c = 1/K_{2a} + 1/K_{2b}$

et $d = 1/K_{2a} K_{2ab}$

Ces paramètres sont évalués au moyen du programme de calcul PS3b.

Le rapport k_{cat}/K_m s'écrit :

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2 \left(1 + \frac{\alpha H}{K_{1a}}\right)}{K_s \left(1 + \frac{H}{K_{oa}}\right) \left(1 + \frac{H}{K_{ob}}\right)} \quad \text{Eq. (81)}$$

qui peut se mettre sous la même forme que k_{cat} , mais les constantes d'ionisation K_{oa} et K_{ob} étant connues indépendamment ; α/K_{1a} peut être évalué au moyen du programme PS1b ; pK_{oa} , constante d'ionisation de l'imidazole du centre actif dans l'enzyme libre a été prise égale à 6,90 (40).

K_m est donné par la relation :

$$K_m = K_s \frac{k_3 \left(1 + \beta \frac{H}{K_{2a}}\right) \left(1 + \frac{H}{K_{oa}}\right) \left(1 + \frac{H}{K_{ob}}\right)}{k_2 \left(1 + \frac{\alpha H}{K_{1a}}\right) \left(1 + H \left(\frac{1}{K_{2a}} + \frac{1}{K_{2b}}\right) + H^2 \frac{1}{K_{2a} K_{2ab}}\right)} \quad \text{Eq (82)}$$

Les valeurs obtenues pour les paramètres β/K_{2a} , $1/K_{2a} + 1/K_{2b}$, $1/K_{2a} K_{2ab}$, α/K_{1a} et k_{cat} , K_m , ces dernières valeurs se rapportant à l'hydrolyse de la forme I du substrat, sont données dans le tableau 8. Les variations des paramètres k_{cat} , K_m et k_{cat}/K_m sont correctement décrites en introduisant les valeurs du tableau 8 dans les équations 79, 81, 82, ce qui constitue une vérification de la cohérence de ces valeurs (voir figures 15, 16). On peut remarquer que K_m est pratiquement constant au-dessous de pH 5, alors que dans cette zone intervient l'ionisation du carboxyle du centre actif (41, 42, 43). La variation du paramètre k_{cat}/K_m en fonction du pH a été analysée jusqu'à pH 3,5 et révèle l'implication de 2 groupements de $pK \sim 4$ dans l'activité de l'enzyme, probablement le carboxyle du centre actif (41, 42, 43) et le carboxyle impliqué dans le changement de conformation de l'enzyme aux pH acides (41). Comme la valeur trouvée pour k_{cat} à pH 4 est nettement plus faible que la valeur calculée, il est vraisemblable que ces deux groupes sont impliqués plutôt au niveau des étapes d'acylation (k_2) et de désacylation (k_3) qu'au niveau de K_s . Les résultats obtenus par J.J. Béchet et A. d'Albis avec des inhibiteurs compétitifs de la trypsine suggèrent que le carboxyle du centre actif intervient dans la fixation de ces inhibiteurs sur l'enzyme (mesurée par pK_I). Nous trouvons par contre que son effet s'exerce plutôt dans le cas présent au niveau des étapes catalytiques. J. Chevallier (44) a obtenu des résultats identiques aux nôtres avec les amides aux pH alcalins, dans la mesure où le groupement de $pK 10$ agit plutôt dans la trypsine native sur k_2 que sur K_s , alors qu'avec les inhibiteurs, on observe une diminution de leur constante d'affinité K_I aux pH alcalins. Il serait cependant nécessaire pour vérifier ces résultats de travailler avec la β trypsine (10) étant donné que le comportement aux pH acides ou alcalins des différentes espèces de trypsine peut varier d'une forme à l'autre.

c) Résultats avec la TME.

L'hydrolyse trypsique de la TME est caractérisée par une étape d'acylation limitante. Les équations 77 et 78 s'écrivent alors :

$$k_{cat} = \frac{k_2 \left(1 + \alpha H/K_{1a}\right)}{1 + H \left(\frac{1}{K_{1a}} + \frac{1}{K_{1b}}\right) + H^2 \left(\frac{1}{K_{1a} K_{1ab}}\right)} \quad \text{Eq (83)}$$

TABLEAU N° 8

Paramètres des équations 79, 81, 83, déterminés à partir des données numériques des tableaux 7 et 9 et du programme de calcul PS3b. Conditions : CaCl_2 0,025 M, 25°. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

	L M E		T M E
$\log(1/K_{2a} + 1/K_{2b})$	6.71 (.07)	$\log(1/K_{1a} + 1/K_{1b})$	8.24 (.06)
$\log 1/K_{2a} K_{2ab}$	11.34 (.06)	$\log 1/K_{1a} K_{1ab}$	14.21 (.06)
$\log \beta/K_{2a}$	7.43 (.07)	$\log \alpha/K_{1a}$	8.93 (.14)
$\log \alpha/K_{1a}$	7.81 (.02) ^a	$\log \alpha/K_{1a}$	9.04 (.03) ^a
$k_{cat.} (\text{sec}^{-1})^b$	6.67 (.28)	$k_{cat.} (\text{sec}^{-1})^b$	.68 (.14)
$K_{m.} (\text{mM})^b$	2.74 (.41)	$K_{m.} (\text{M})^b$	.17 (.03)

a Valeur déterminée à partir des variations de $k_{cat.}/K_m$ en fonction du pH en prenant $\text{pK}_{oa} = 7,28$ dans le cas de la LME et 7,3 dans le cas de la TME, $\text{pK}_{ob} = 6,90$ dans les deux cas.

b Paramètres extrapolés à $\text{H}^+ = 0$ et se rapportant à la forme I α aminée des substrats.

$$K_m = K_s \frac{(1 + \frac{H}{K_{oa}}) (1 + \frac{H}{K_{ob}})}{1 + H (\frac{1}{K_{1a}} + \frac{1}{K_{1b}}) + H^2 (\frac{1}{K_{1a} K_{1ab}})} \quad (84)$$

le rapport k_{cat}/K_m étant toujours donné par la relation 81.

Le pK du groupement α aminé de ce substrat a été trouvé égal à 7,30, donc voisin de celui de la LME. Le pK de ce même groupe pour la tyrosine (produit P₂ titré) a été pris égal à 9,1 (37).

Les variations des paramètres k_{cat} , K_m et k_{cat}/K_m avec le pH sont données dans le tableau 9 et les figures 17 et 18.

En utilisant la même méthode pour évaluer les paramètres $1/K_{1a}$, $1/K_{1b}$ et $1/K_{1a}K_{1ab}$ que dans le cas de la LME, on obtient les valeurs données dans le tableau 8.

Le profil k_{cat} en fonction du pH a la même allure que dans le cas de la LME mais est fortement déplacé vers les pH alcalins (optimum de pH pour k_{cat} de l'ordre de 7,5 au lieu de 5,8 pour la LME). La variation de K_m en fonction du pH est correctement évaluée à partir des valeurs données dans le tableau 8 et de l'équation 84.

On peut remarquer que les maxima dans les représentations k_{cat}/K_m et K_m en fonction du pH sont plus accentuées que dans le cas de la LME.

d) Données avec la lysine paranitroanilide (LPA).

La lysine paranitroanilide est un "mauvais substrat" de la trypsine dans la mesure où sa vitesse maximum d'hydrolyse est beaucoup plus faible que celle du DL BAPA (45). L'étape d'acylation est limitante pour ce substrat comme dans le cas des amides spécifiques (44). L'analyse cinétique de l'hydrolyse de ce substrat en fonction du pH est compliquée du fait qu'il apparaît à partir de pH 7 un phénomène d'activation par le substrat (figure 19) correctement décrit par l'équation de

$$\text{vitesse} = \frac{a}{1 + cx + dx^2} \quad (53)$$

les paramètres a, b, c, d étant évalués au moyen

du programme de calcul PS3a pondéré. On trouve ainsi à pH 8,53, Tris 0,032 M, CaCl₂ 0,025 M, 25°,

$$k_{cat1} = \frac{a}{c} = (0,313 \pm 0,02) 10^{-2} \text{ sec}^{-1} ; K_{m1} = \frac{1}{c} = (5,1 \pm 0,7) 10^{-4} \text{ M} ;$$

$$k_{cat2} = \frac{ab}{d} = (1,90 \pm 0,09) 10^{-2} \text{ sec}^{-1} \text{ et } K_{m2} = \frac{c}{d} = 0,0325 \pm 0,0044 \text{ M, en prenant}$$

$$\Delta\epsilon_{410m\mu}(\text{paranitroaniline/LPA}) = 8300 \quad (46).$$

T A B L E A U N° 9

Paramètres k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m d'hydrolyse trypsique de la TME en fonction du pH à 25°, $CaCl_2$ 0,025 M. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses (programme de calcul PS1a non pondéré).

pH	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ sec ⁻¹)
5.50	0.69 (0.03)	130.00 (8.40)	6.87
6.00	1.59 (0.11)	75.90 (11.30)	20.90
6.50	2.68 (0.13)	60.70 (5.60)	44.10
7.00	2.75 (0.14)	40.50 (4.20)	67.80
7.50	3.08 (0.30)	66.40 (10.50)	46.30
8.00	2.39 (0.18)	98.40 (10.20)	24.30
8.80	1.09 (0.55) ^a	148.00 (61.00) ^a	10.80

L'erreur standard importante sur ces valeurs s'explique par la faible solubilité du substrat à ce pH.

Figure 17 - Hydrolyse trypsique de la TME en fonction du pH. Profil k_{cat} vs pH. Les données sont expérimentales, la courbe est calculée à partir de l'équation 83 et des valeurs données dans le tableau 9. Conditions : voir tableau 9.

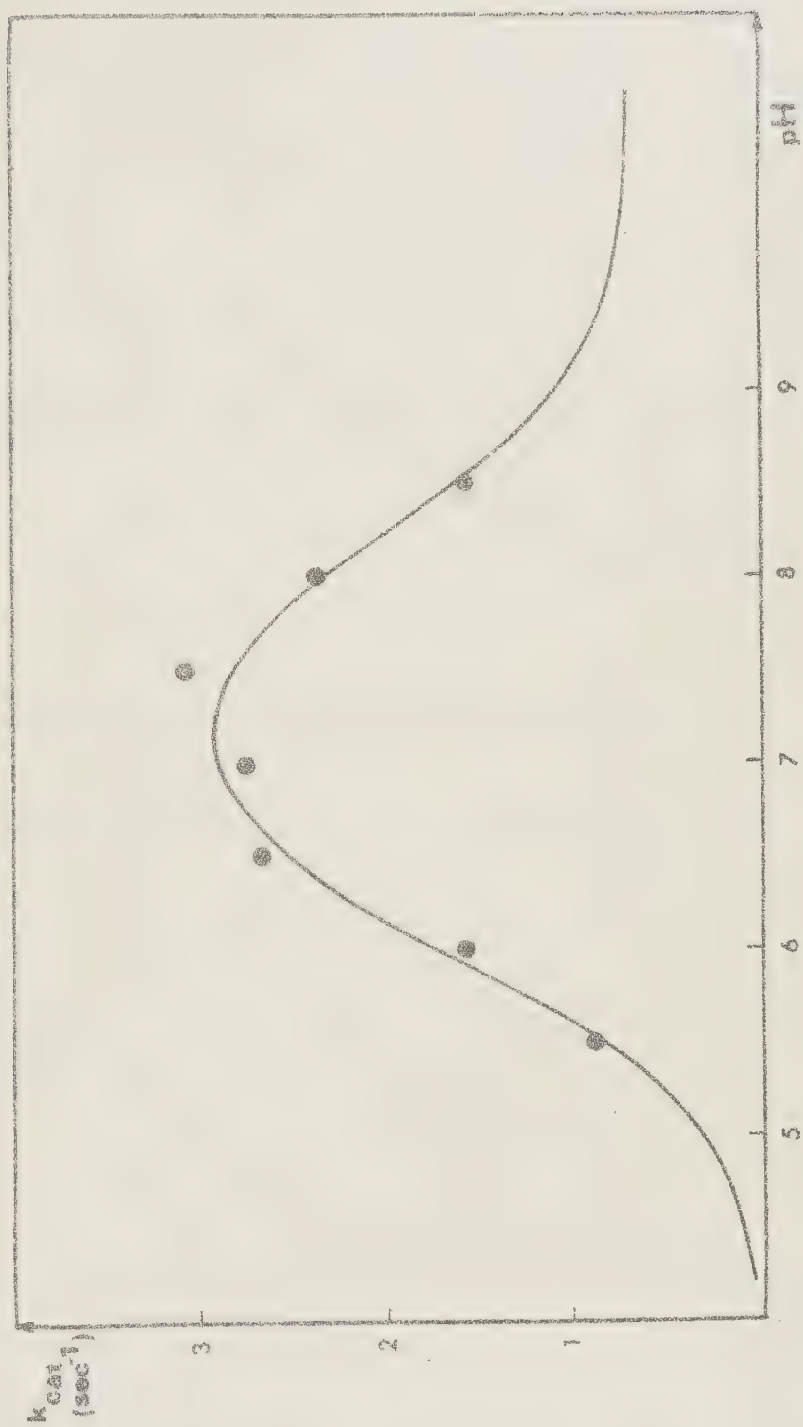


Figure 16 - Hydrolyse trypsique de la TME en fonction du pH. Profils $\log k_{cat}/K_m$ vs pH. Les points sont expérimentaux, les courbes calculées (voir texte).
Conditions : voir tableau 9.

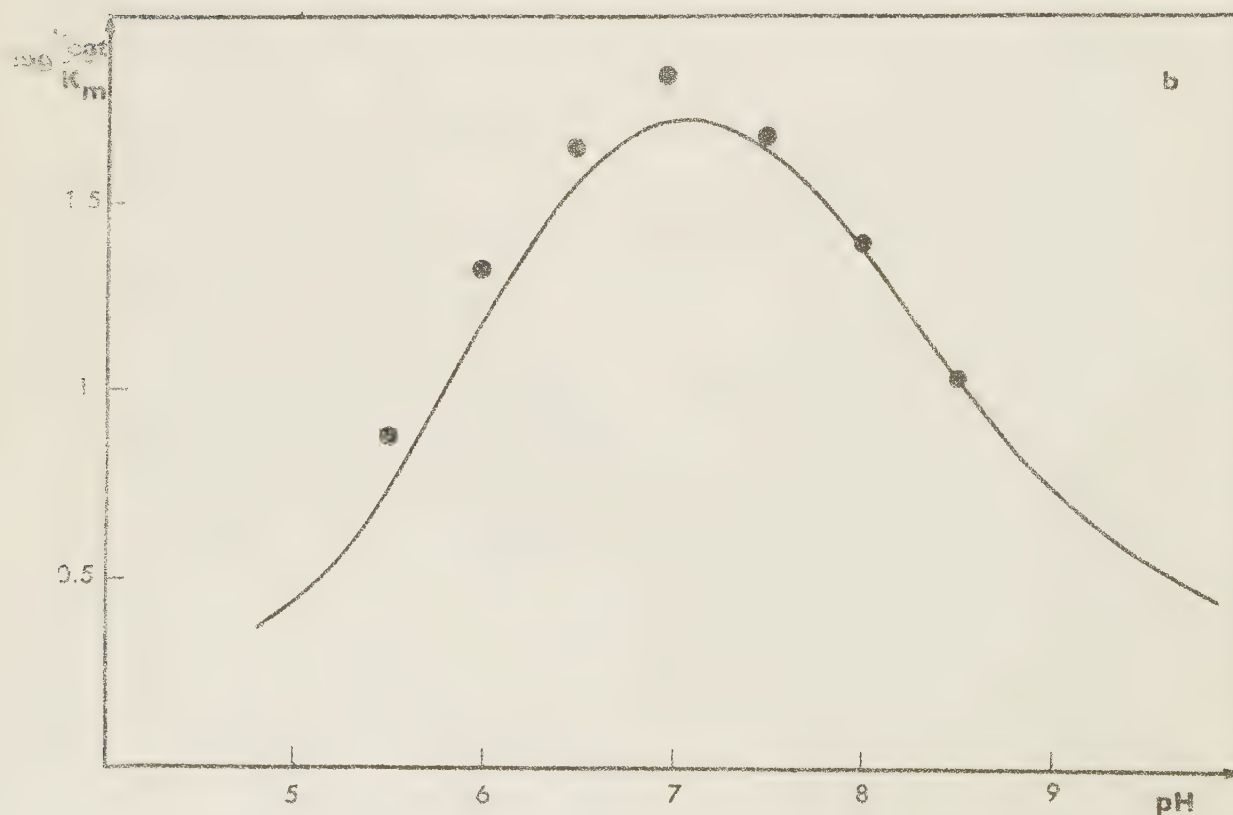
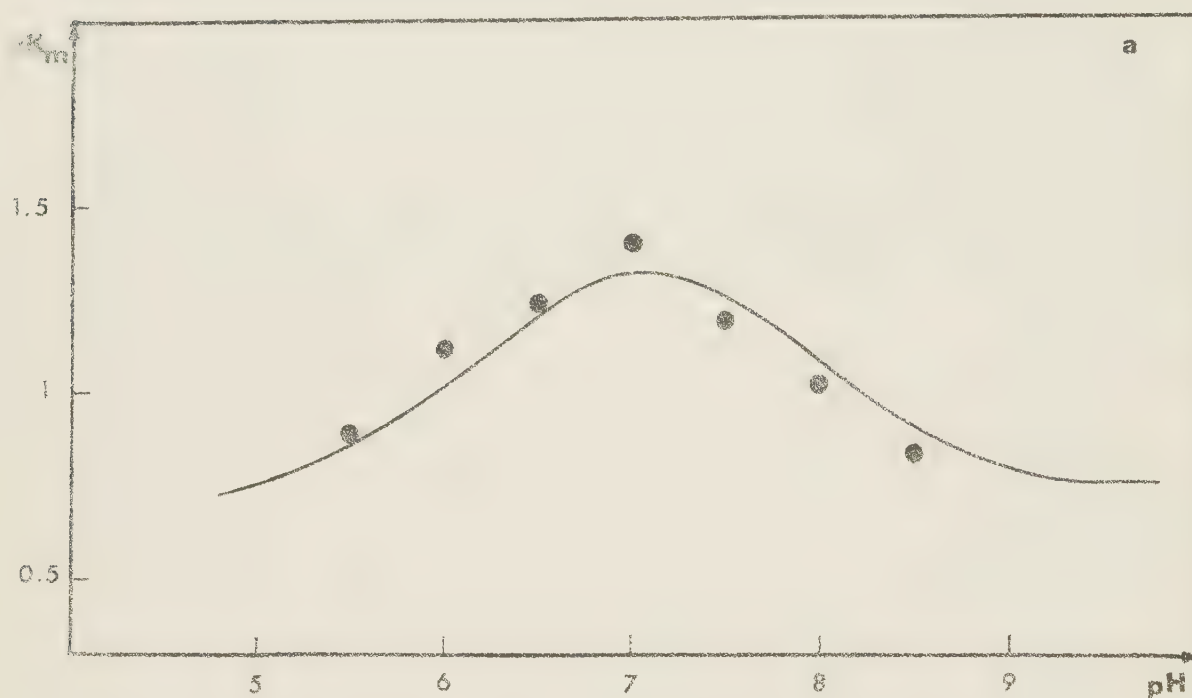
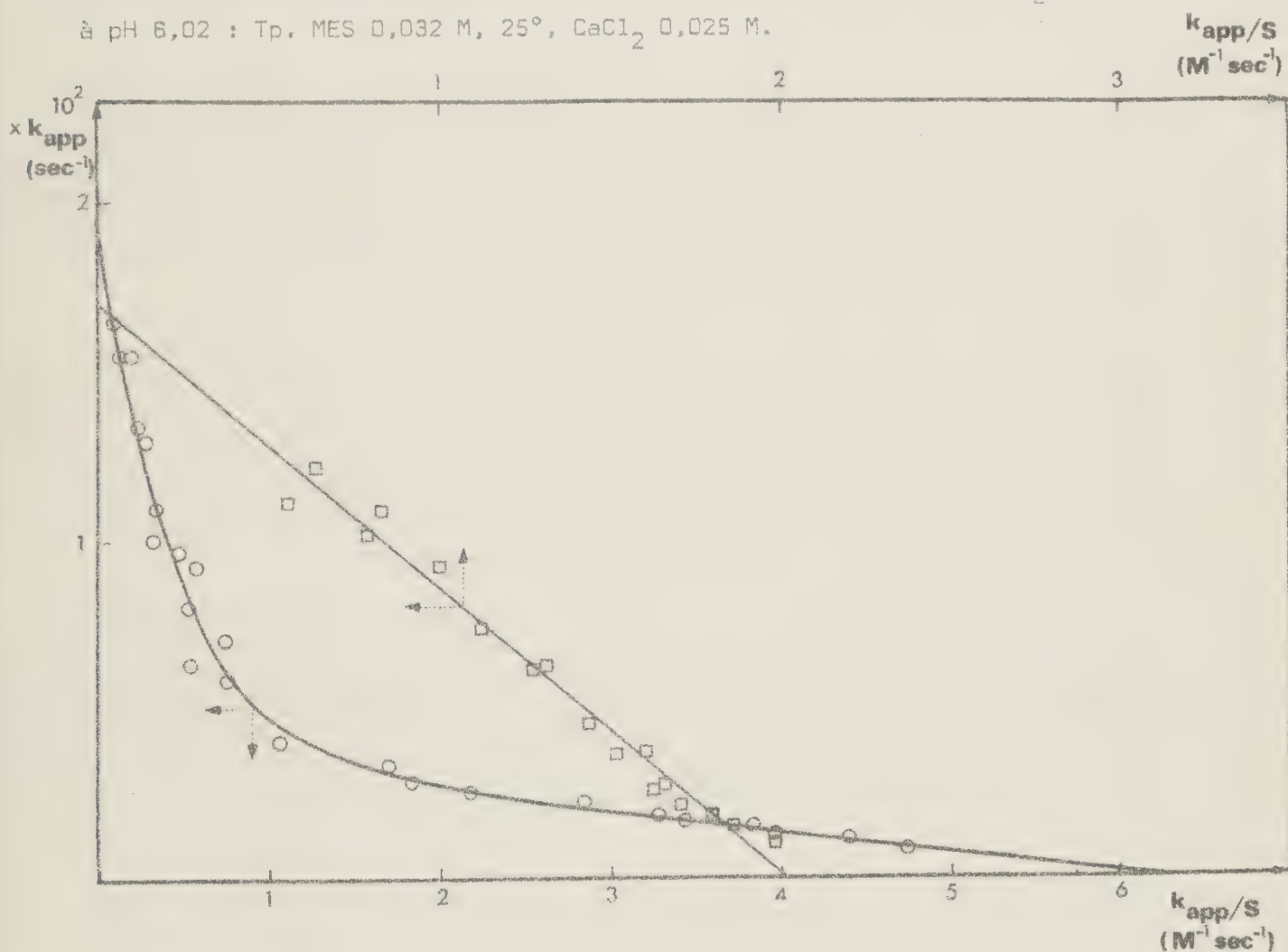


Figure 19 - Comparaison de l'hydrolyse trypsique du LPA à pH 6,02 ($\square$) et 8,53 ($\circ$). L'activation par le substrat est très nette à pH 8,5 et la courbe correspondante (représentation d'Eadie) est calculée à partir de l'équation 53 et des valeurs données dans le texte. Conditions, à pH 8,53 : Tp. Tris 0,032 M, 25°, CaCl_2 0,025 M ; à pH 6,02 : Tp. MES 0,032 M, 25°, CaCl_2 0,025 M.



Jusqu'à pH 6,6, les cinétiques sont correctement décrites au moyen de l'équation de Michaelis^a (3) (figure 19) et le profil k_{cat} en fonction du pH (fig. 20) accuse un maximum vers pH 6,4, ce qui indique une valeur du coefficient d dans l'équation 80 de l'ordre de 10^{13} , donc beaucoup plus forte que dans le cas de la LME. Il n'a pas été possible cependant d'analyser complètement le profil k_{cat} en fonction du pH dans ce cas, étant donné l'imprécision des valeurs de k_{cat} obtenues entre pH 7 et 8. Cependant, il est évident que le pH optimum dans ce cas est déplacé vers les pH alcalins par rapport à celui de la LME, mais moins fortement qu'avec la TME.

e) Discussion de l'effet du pH sur l'hydrolyse de la LME, de la TME et du LPA.

Le résultat le plus marquant de cette étude est la valeur anormalement faible obtenue pour le paramètre $1/K_{2a}K_{2ab}$ dans le cas de la LME, ce qui se traduit par un maximum d'activité vers pH 5,8 pour ce substrat au lieu de 8 environ dans le cas des substrats α N acylés (15). Pour évaluer les constantes microscopiques du schéma cinétique 5, il est cependant nécessaire de faire une hypothèse sur leur ordre de grandeur relatif, étant donné que dans l'équation 79 figurent 5 paramètres : α , k_3 , $1/K_{2a}$, $1/K_{2b}$ et $1/K_{2ab}$ et que l'on ne dispose que des 4 paramètres expérimentaux de l'équation 80.

On peut par exemple admettre que le rapport des constantes K_{2a} et K_{2b} est le même que celui des constantes K_{0a} et K_{0b} , soit $pK_{2a} - pK_{2b} = 0,38$; on obtient alors les valeurs des constantes d'ionisation K_{2a} , K_{2b} et K_{2ab} données dans le tableau 10 avec celles obtenues pour la TME en faisant la même hypothèse, qui peut paraître arbitraire, mais étant donné les importantes variations du paramètre $1/K_{2a}K_{2ab}$ d'un substrat à l'autre, les conclusions qualitatives de ce travail ne seraient pas beaucoup modifiées par un choix différent du rapport K_{2a}/K_{2b} (ou K_{1a}/K_{1b} dans le cas de la TME) comme en témoigne la figure 21.

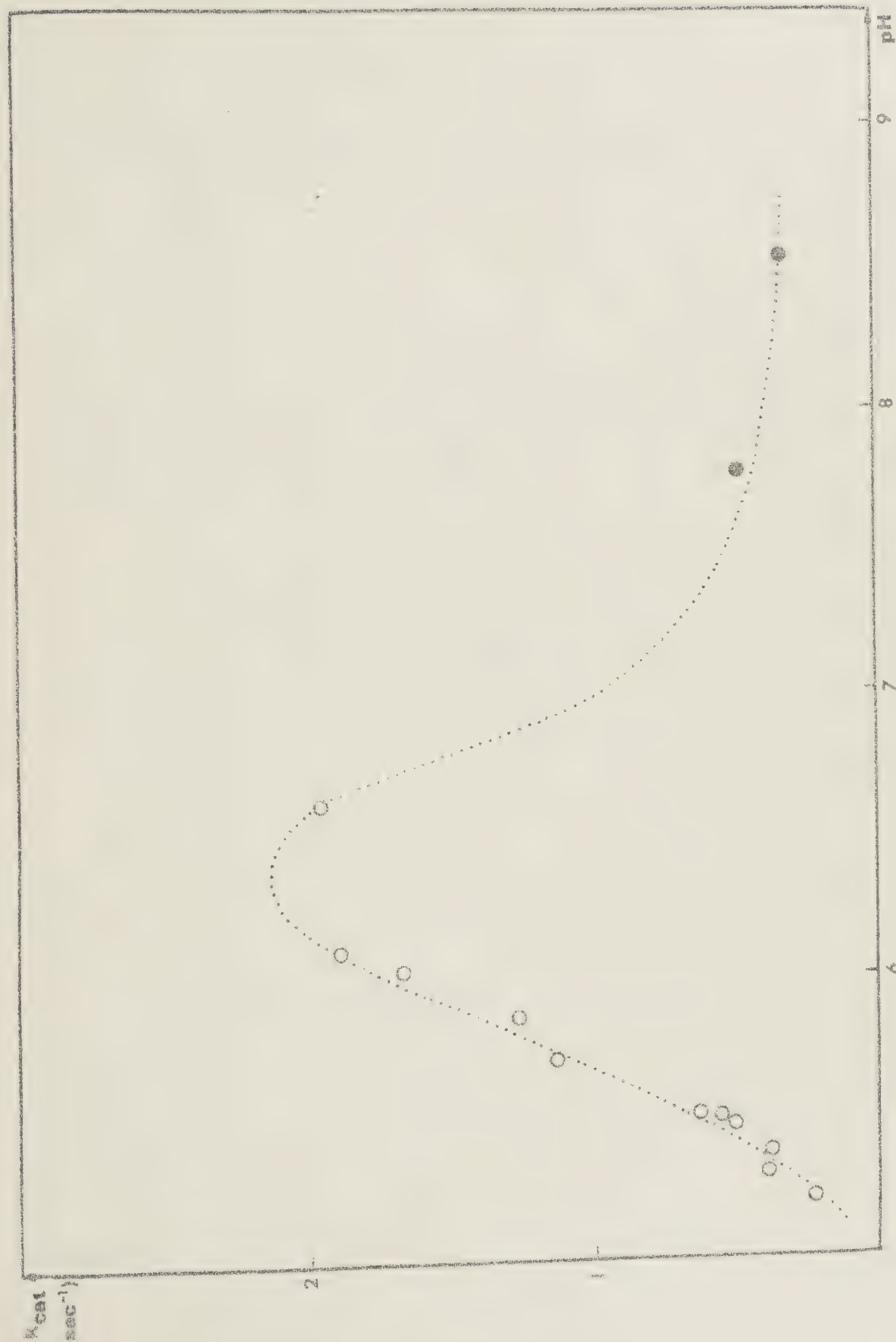
La valeur de pK_{2b} pour la LME est très proche de celle obtenue pour le BAEE (15), ce qui peut constituer un élément en faveur de l'hypothèse précédente. La faible valeur de pK_{2ab} par rapport à celle de pK_{2b} indique que l'ionisation de l'imidazolium du centre actif est favorisée par la présence du groupement α aminé chargé du substrat, ce qui doit être rapproché de l'effet de la force ionique sur l'ionisation de ce groupement observé par J.J. Béchet et coll. (47), qui implique la présence de 2 groupements α aminés de l'enzyme à proximité du centre actif.

^aOn trouve ainsi à pH 6,03, tampon MES 0,032 M, $CaCl_2$ 0,025 M, 25° :

$$k_{cat} = (1,67 \pm 0,051) 10^{-2} \text{ sec}^{-1} \text{ et } K_m = 0,083 \pm 0,0055 \text{ M.}$$

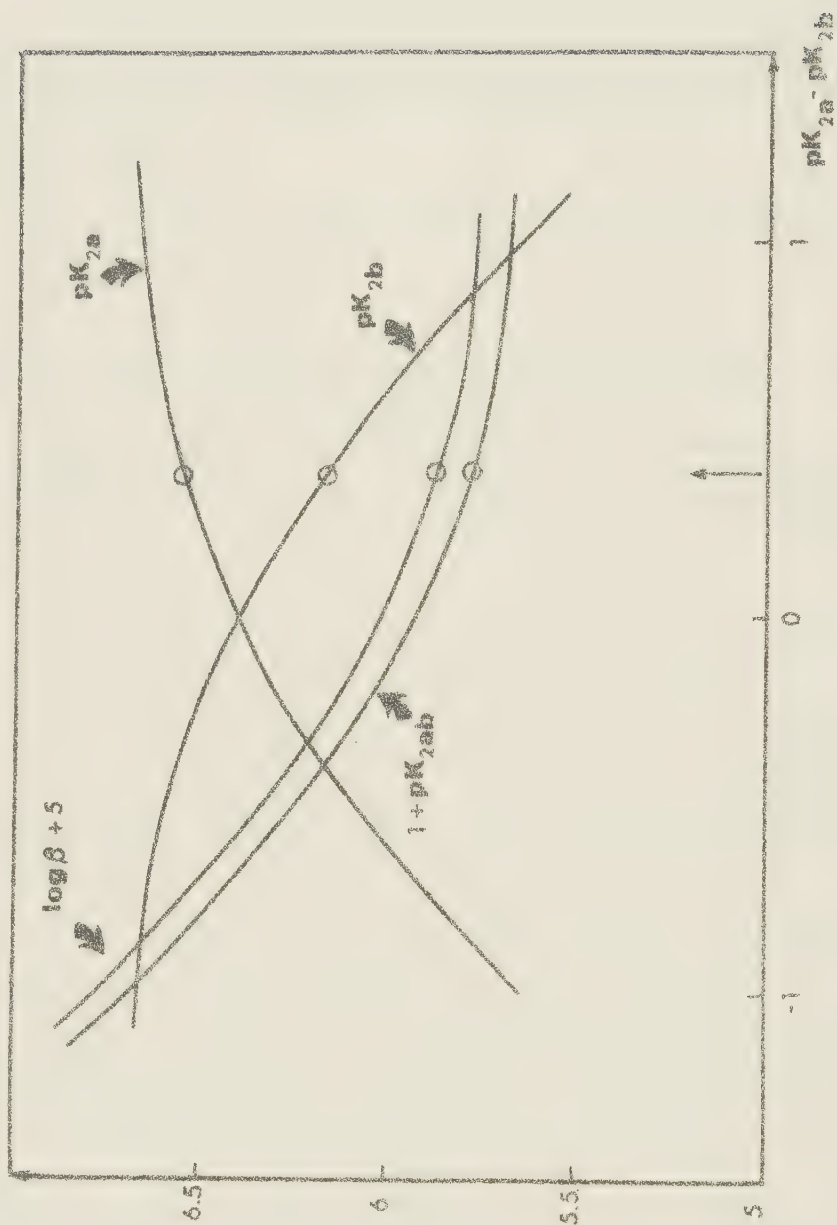
^bRappelons ici la signification de ces constantes d'ionisation. L'indice 2 indique qu'elles se rapportent à l'acylenzyme (indice 0 pour l'enzyme libre et indice 1 pour le complexe de Michaelis). La constante K_{2a} correspond à l'ionisation du substrat une fois l'imidazole du centre actif déchargé, et la constante K_{2b} à l'ionisation de l'imidazole lorsque le substrat est sous la forme I (déchargée sur son groupement α aminé). La constante K_{2ab} correspond à l'ionisation de l'imidazole lorsque le substrat est chargé sur son groupement α aminé (forme II).

Figure 20 - Effet du pH sur l'hydrolyse de la lysine parentroamylide. Profil k_{cat} vs pH. 25°, $CaCl_2$ 0,025 M.



: Valeurs de k_{cat} obtenues à partir du programme de calcul MS12 (équation de Michaelis-Menten) à pH 6.52 ou 7.52. Force ionique constante $\mu = 0.71$ ($NaCl$) en tenant compte de la contribution du substrat électrostatique. Valeurs de k_{cat} et de K_m obtenues à partir du programme de calcul MS32 (activation par le substrat) (voir tableau). Ip Tris 0,025 M.

Figure 21 - Variations des paramètres pK_{2a} , pK_{2b} , pK_{2ab} et β dans le cas de la LME suivant la valeur choisie pour la différence $pK_{2a} - pK_{2b}$. Les points indiquent les valeurs de ces paramètres pour $pK_{2a} - pK_{2b} = 0.38$ qui est la valeur utilisée dans ce travail.



T A B L E A U N° 10

Paramètres α , β et constantes microscopiques de dissociation du schéma 5 calculés en prenant $pK_{2a} - pK_{2b} = 0,38$ pour la LME et $pK_{1a} - pK_{1b} = 0,40$ pour la TME.

	LME		TME
pK_{2a}	6.65	pK_{1a}	8.10
pK_{2b}	6.27	pK_{1b}	7.70
pK_{2ab}	4.79	pK_{1ab}	6.11
β	7.60	α	5.80
$\log \alpha/K_{1a}$	7.81		

L'interprétation la plus simple de ce phénomène consiste à admettre une interaction électrostatique répulsive entre le groupement αNH_3^+ du substrat et l'ion imidazolium ayant pour effet d'abaisser le pK de ce dernier ($\text{pK}_{2b} - \text{pK}_{2a} = 1,48$).

En utilisant la relation (15) :

$$\Delta G_{el} = \frac{305 Z_1 Z_2}{r(6r - 7)}$$

dans laquelle ΔG_{el} est l'enthalpie libre d'interaction électrostatique ainsi définie et calculable à partir de $\text{pK}_{2b} - \text{pK}_{2a}$, Z_1 et Z_2 la charge des deux ions, r la distance moyenne de ces charges, le terme $6r - 7$ constituant une évaluation approximative de la constante diélectrique locale, on obtient pour r , distance séparant le groupement α aminé chargé du substrat et l'imidazolium du centre actif, la valeur de 5,6 Å. Ce calcul suppose que la géométrie des complexes ES'H et ES' soit la même.

Dans le cas du LPA, la valeur du paramètre $1/K_{2b}K_{2ab}$ est de l'ordre de 10^{13} ; ceci implique que $\text{pK}_{1ab} > 6$ avec $\text{pK}_{1b} \sim 7$, comme dans le cas des amides spécifiques (44). Ainsi donc l'interaction entre l'imidazolium et le groupement aminé chargé du substrat serait beaucoup plus forte au niveau de ES' que de ES, peut être en raison d'une orientation différente du substrat au sein de ces complexes. (r augmentant dans ES par rapport à ES'). Ceci est confirmé par les résultats différents de la compétition nucléophile à pH 4,8 et 5,8 avec la LME (voir figure 13) qui impliquent une augmentation du rapport k_2/k_3 en fonction du pH, k_2/k_3 a été en effet trouvé de l'ordre de 5 à pH 4,8 (13) et ≥ 20 à pH 5,8. Cette augmentation d'un facteur 4 environ de ce rapport de pH 4,8 à 5,8 peut être expliquée quantitativement si $\text{pK}_{1ab} - \text{pK}_{2ab} > 1$, l'ionisation de l'imidazole étant déplacée vers les pH alcalins au niveau du complexe de Michaelis formé avec le substrat bicationique par rapport à l'acylenzyme.

Dans le cas de la TME, $\text{pK}_{1b} - \text{pK}_{1ab} = 1,59$, ce qui peut être attribué à l'interaction électrostatique précédemment définie. La valeur élevée de pK_{1b} dans ce cas est voisine de celle observée avec le TSAME au niveau de l'acylenzyme, mais on ne peut aller plus loin dans ce rapprochement étant donné les structures totalement différentes du TSAME et de la TME. Quoiqu'il en soit, cette valeur élevée de pK_{1b} indique une stabilisation de l'ion imidazolium dans le complexe ES, probablement du fait du rapprochement du carboxyle du centre actif qui n'est pas neutralisé dans ce cas à la différence du TSAME. Il est donc possible qu'avec ce substrat le microenvironnement du centre actif varie considérablement lors de la décharge du substrat, modifiant ainsi son orientation et que la valeur de $\text{pK}_{1b} - \text{pK}_{1ab}$ ne puisse s'expliquer uniquement en termes de répulsion électrostatique, à la différence de la LME pour laquelle le groupement ϵ aminé de la lysine neutraliserait le carboxyle du centre actif et maintiendrait le substrat dans une conformation rigide indépendamment de l'état d'ionisation du groupement αNH_2 .

Il apparaît que les constantes de vitesse k_2 et k_3 sont augmentées d'un facteur 7 environ lorsque le substrat est chargé sur son groupement α aminé

($\beta = 7,6$ pour la LME et $\alpha = 5,8$ pour la TME). Cet effet peut s'interpréter comme une augmentation de la réactivité de la fonction ester du fait de l'effet inductif du groupement αNH_3^+ (48). Il est possible également que cette charge en α permette une meilleure orientation du substrat ou un changement du micro-environnement du centre actif favorable à la catalyse. Il nous semble cependant que le facteur réactivité est ici prépondérant étant donné le même ordre de grandeur obtenu pour β avec la LME et pour α avec la TME, l'un étant un substrat spécifique et l'autre un substrat non spécifique.

Dans les deux cas, ce sont ces valeurs de α et β supérieures à l'unité et le fait que $\text{pK}_b > \text{pK}_{ab}$ qui rendent compte des profils k_{cat} en fonction du pH très particuliers (55) de ces substrats sur la base du schéma cinétique 5.

La comparaison des paramètres cinétiques obtenus pour ces substrats à ceux de substrats α N acylés (tableau 11) indique que l'augmentation de la vitesse maximum d'hydrolyse lorsqu'on passe du substrat α aminé au dérivé N acylé correspondant est beaucoup plus importante lorsque ces substrats sont caractérisés par une étape d'acylation limitante (LPA, TME) que par une étape de désacylation limitante (LME).

Il est donc vraisemblable que le groupement α peptidique de la plupart des substrats synthétiques joue un rôle plus important au niveau du complexe de Michaelis qu'au niveau de l'acylenzyme. Ceci peut expliquer les résultats de Shalitin montrant que la présence d'une liaison α peptidique est un facteur important dans l'hydrolyse trypsique de substrats aspécifiques (49). Cette conclusion va également dans le sens des résultats du chapitre II indiquant que *les facteurs structuraux de spécificité du substrat ont un rôle plus important au niveau de l'étape d'acylation que de la désacylation.*

f) Signification du phénomène d'activation par le substrat observé avec le LPA.

Le phénomène d'activation par le substrat observé avec le LPA est très curieux dans la mesure où aucun effet de ce type n'avait pu être décelé jusqu'à présent avec les amides, c'est-à-dire au niveau du complexe de Michaelis (50). Ce résultat peut être interprété de plusieurs façons différentes :

1) Par suite de l'hétérogénéité de la trypsine. On conçoit en effet que si les diverses formes de la trypsine ont une activité différente vis-à-vis du LPA, on observe alors une saturation globale de l'enzyme non michaelienne. Mais l'inactivation de la trypsine en fonction du temps par le TLCK est la même qu'elle soit mesurée sur le BAEE ou sur le LPA à 2 concentrations différentes (10^{-3} M et $5 \cdot 10^{-2}$ M à pH 8,5). Il est donc vraisemblable qu'un tel phénomène ne puisse être invoqué ici, sauf si les différentes formes de trypsine présentent la même réactivité vis-à-vis du TLCK^a.

^aCeci pourrait être vérifié en utilisant les trypsines α et β (10).

TABLEAU N° 11

Comparaison des paramètres cinétiques d'hydrolyse trypsique au pH optimum et à 25° de substrats à groupement α aminé libre ou α N acylés.

	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}\text{sec}^{-1}$)	Réf.
TME	.68	177	3.85	a
ATEE	22.25 ^b	29	767	c
LME	6.67	.275	24300	a
BLME	16.60	.017	994000	(54)
ALME	82.00	.24	342000	(24)
LPA	.0031	.51	6.1	a
	.019 ^d	32.5 ^d	.585 ^d	a
BAPA ^b	1.90	.55	3450	(52)

a : déterminés dans ce travail

c : N. Kellersohn. Communication personnelle.

b : à 30°.

d : paramètres k_{cat_2} , K_{m_2} et k_{cat_2}/K_{m_2} (voir texte)

e : ce paramètres doit être multiplié par 2 pour tenir compte du remplacement du méthyl par un éthyl dans sa fonction ester (15).

2) Par un mécanisme identique à celui mis en jeu dans le cas du TSAME (23) et impliquant un site secondaire de fixation du substrat modifiant les propriétés catalytiques du site principal. Mais dans le cas présent, ce site serait accessible dans le complexe de Michaelis et seulement à la forme I déchargée en α du substrat.

3) Enfin par l'*existence de transpeptidations*. Il est bien connu en effet qu'à partir de la lysine amide la trypsine puisse effectuer la synthèse de dilysine-amide et d'oligolysine-amides, celles-ci devant être hydrolysées beaucoup plus rapidement que le monomère initial d'après Nachlas (51, 53).

Le mécanisme de ces transpeptidations peut être décrit à partir du schéma 4 : la lysine amide formerait avec la trypsine un acylenzyme qui pourrait réagir avec le groupement αNH_2 déprotoné d'une seconde molécule de lysine amide agissant comme nucléophile. Il se formerait alors une dilysine amide qui elle-même pourrait conduire à la trilysine amide suivant le même mécanisme, etc...

Un certains nombres de résultats obtenus au laboratoire semblent indiquer que ces réactions de transpeptidation sont très importantes avec le LPA au-dessus de pH 7 et pour des concentrations de substrat $> 10^{-2}$ M. A. Dupaix^a en étudiant l'hydrolyse trypsique du TSAME à pH 8,5 en présence de LPA $> 10^{-2}$ M s'est aperçu qu'il ne titrait pratiquement plus de protons au-dessus de cette concentration, ce qui pourrait indiquer l'accumulation de tosyl arginyl lysine paranitroanilide dans le milieu réactionnel. Une autre expérience est significative à cet égard : si on ajoute à pH 8 à une solution de LPA $\approx 5 \cdot 10^{-2}$ M, en présence de trypsine, une petite quantité de TSAME ou de BAEE (concentration finale de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} M), on observe immédiatement une augmentation très importante de la vitesse d'apparition de la paranitroanilide. Ce résultat s'interprète aisément si on admet la formation de tosyl arginyl lysine paranitroanilide qui serait hydrolysée beaucoup plus rapidement que le LPA (51)^b. Il serait intéressant d'analyser de tels milieux réactionnels par chromatographie en couche mince ou par électrophorèse pour identifier les produits de la transpeptidation.

Ces données indiquent qu'il faut envisager avec beaucoup de circonspection ce phénomène d'activation par le substrat et que dans l'état actuel de nos résultats il n'est pas possible d'en proposer un mécanisme plausible.

^aA. Dupaix - Communication personnelle.

^bIl est vraisemblable que la seconde molécule de LPA impliquée dans la transpeptidation se fixe au niveau du site hydrophobe mis en évidence avec les alcools.

C H A P I T R E I V

EFFET DES AMINES SUR L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE SUBSTRATS NEUTRES^a.

Inagami (56.40) a démontré que les alkyl amines et alkylguanidines de petite taille pouvaient activer l'hydrolyse trypsique de l'AGEE. Il interprète ce résultat sur la base d'un ajustement de la conformation de l'enzyme induit par ces effecteurs considérés comme autostériques (57) par analogie avec la chaîne cationique des substrats spécifiques : la combinaison du substrat aspécifique et de l'amine A (AGEE et ethylamine) au sein d'un complexe ternaire ESA reconstitue la structure d'un substrat spécifique (acetyl Lysine ethyl ester), ce qui entraîne une augmentation de la vitesse d'hydrolyse du substrat aspécifique (AGEE) au sein de ce complexe.

Cette interprétation *extrêmement simple* a été contestée par Erlanger (58) qui montre que des amines de grande taille (à plus de 4 atomes de carbone) peuvent également activer de façon importante l'hydrolyse trypsique de l'AGEE.

Comme ces phénomènes peuvent permettre d'expliquer le rôle de la chaîne cationique des substrats spécifiques dans la catalyse trypsique, nous avons entrepris l'étude systématique de l'effet d'alkylamines à longueur de chaîne hydrocarbonée variable sur l'hydrolyse trypsique de l'AGEE et de l'AGPNE.

I - RESULTATS EXPERIMENTAUX

L'hydrolyse trypsique de l'AGPNE est caractérisée par une *étape de désacylation limitante* comme en témoigne la valeur élevée de $k_{cat} = 0.36 \text{ sec}^{-1}$ à pH 7^b par rapport à la valeur de ce paramètre observée pour l'AGEE au même pH soit 0.019 sec^{-1} , ce substrat étant caractérisé lui-même par une *étape d'acylation limitante*.

La valeur obtenue pour la vitesse maximum d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE est voisine de celle donnée par Knowles (1) dans le cas de la chymotrypsine : elle correspond à l'étape de désacylation. Comme Bender (59) a démontré que les constantes de désacylation, d'acylchymotrypsines et d'acyltrypsines formées à partir de substrats non chargés étaient voisines, ceci constitue un argument supplémentaire en faveur d'une étape de désacylation limitante pour l'AGPNE.

Par ailleurs, nous avons observé à l'état préstationnaire pour ce même substrat avec S de l'ordre de K_m un faible jet de paranitrophénol ce qui indique

^aCe travail a bénéficié de la collaboration de G. Coutouly et a fait l'objet de son DEA (1969).

^bCette valeur est calculée à partir de la valeur de k_{cat} à pH 6.3 en prenant pour le pK de l'imidazole du centre actif pK = 6.83.

également que $k_2 > k_3$ (voir chapitre I , 2ème partie.).

L'analyse cinétique de l'hydrolyse trypsique de l'AGPNE a été effectuée suivant la méthode spectrophotométrique en titrant le paranitrophenol libéré (produit P_1) à des longueurs d'onde de 320, 347.5 et 360 nm en utilisant les valeurs de $\Delta\epsilon$ déterminées pour le paranitrophenyl acetate (voir chapitre I de cette 3ème partie).

L'AGPNE est caractérisée par une hydrolyse spontanée importante même en dessous de pH 7 (solvolyse), celle-ci a donc été mesurée soigneusement avant l'introduction de l'enzyme dans le milieu réactionnel et déduite de la vitesse globale observée.

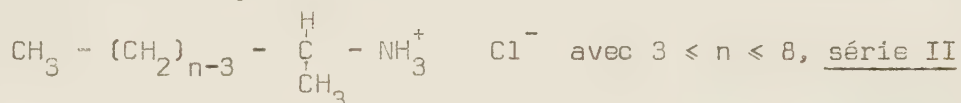
a - EFFET D'UNE SERIE D'ALKYLAMINES SUR L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AGPNE POUR $S < K_m$.

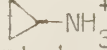
Cette étude a été effectuée à pH 4.95 pour les deux séries d'alkylamines suivantes , en position 1 et 2:

1 alkylamines (chlorhydrate) :



d.1 2 alkylamines (chlorhydrate) :



La cyclopropylamine : () et le 3 aminoheptane ont également été utilisés. Ces amines se présentent dans la zone de pH étudiée sous la forme d'ions alkylammonium , leur pK étant supérieur à 10 (60), sauf dans le cas de la cyclopropylamine (58).

L'aminolyse du substrat est plus importante dans la série I que dans la série II, l'hydrolyse spontanée du substrat pouvant se mettre sous la forme:

$$-\left[\frac{dS}{dt}\right]_{sp} = k_o \cdot S + k_A \cdot A \cdot S \quad \text{ou } k_o \text{ est la constante d'hydrolyse en absence d'amine}$$

et k_A la constante de vitesse correspondant à l'aminolyse du substrat. L'effet des amines sur l'hydrolyse spontanée du substrat dans la zone de concentration étudiée est beaucoup plus faible que leur effet sur l'hydrolyse enzymatique, ce qui élimine la possibilité d'une aminolyse du substrat catalysée par l'enzyme et décrite par le schéma cinétique 4, comme Inagami l'avait déjà constaté à pH 6.6 avec l'AGEE (58).

Une telle aminolyse devrait être observée à des pH > 8 où une fraction appréciable de l'amine se trouve sous sa forme libre agissant comme nucleophile (60)

Les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau 12 et les figures 22,23,24.

T A B L E A U N° 12

Effet des 1 et 2 alkylamines sur l'hydrolyse trypsique de l'AGPNE à pH $4,95 \pm 0,05$. Tampon acétate 0,032 M. Force ionique constante $\mu = 0,58M$ (NaCl), $CaCl_2$ 0,025 M, 25° , $S \approx 4.10^{-4}$ M, donc inférieure à K_m^a . Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

Amine	r_m	$10^2 \times K_A$ (M)	r_m/K_A (M ⁻¹)
1 éthylamine	5.58 (.19)	10.00 (.86)	55 (4.10)
1 propylamine	#.63 ^b	#3.9 ^b	16 ^b
1 butylamine	.22 (.01)	.40 (.04)	54 (5.70)
1 pentylamine	#.75 ^b	#1 ^b	75 ^b
1 hexylamine	4.40 (.28)	4.84 (.76)	91 (13.00)
1 heptylamine	5.82 (.40)	3.51 (.47)	166 (21.20)
1 octylamine	4.25 (.12)	2.21 (.17)	192 (13.80)
2 propylamine	9.86 (1.12)	76.00 (15.00)	13 (1.20)
2 butylamine	3.16 (.12)	16.00 (2.06)	20 (2.15)
2 pentylamine	10.63 (.46)	15.10 (1.26)	70 (4.90)
2 hexylamine	35.45 (1.45)	31.30 (1.49)	113 (2.50)
2 heptylamine	46.50 (2.11)	25.50 (2.00)	183 (10.40)
2 octylamine	31.20 (1.14)	13.50 (.68)	232 (8.50)
3 heptylamine	11.00 (.55)	26.10 (2.20)	42 (2.30)
cyclopropylamine	10.60 (.39)	2.83 (.31)	373 (28.50)
cyclopropylamine ^c	11.52 (.17)	4.17 (.12)	276 (6.20)

^a $K_m = 1,40.10^{-3}$ M environ dans ces conditions.

^b Valeurs évaluées graphiquement.

^c pH 4,86.

Figure 22 - Effet de l'éthylamine sur l'hydrolyse tryptique de l'AGPNE. Conditions : voir Tableau 12. Représentations de la vitesse relative r en fonction de la concentration en acide A et en fonction du rapport $r - 1/A$ (Eq. 27, forme linéarisée).

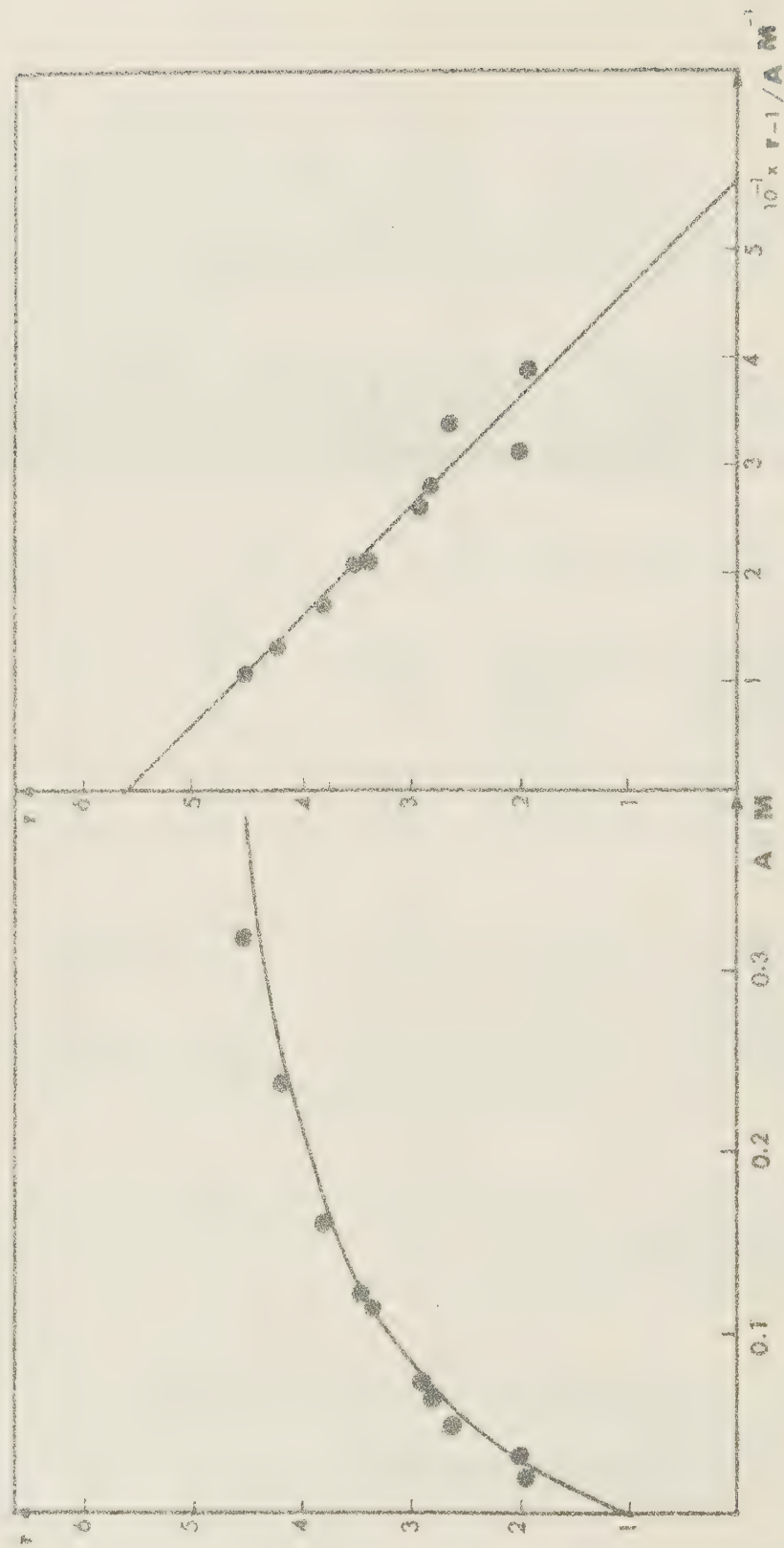


Figure 23 - Effets comparés de la 2 butylamine (a) et de la 1 butylamine (b) sur l'hydrolyse trypsique de l'AGPE. Conditions : voir tableau 12. Les représentations linéaires de ces effets sont données en a' et b'. La 1 butylamine inhibe la réaction dans ces conditions ($r_m < 1$) alors que la 2 butylamine l'active ($r_m > 1$).

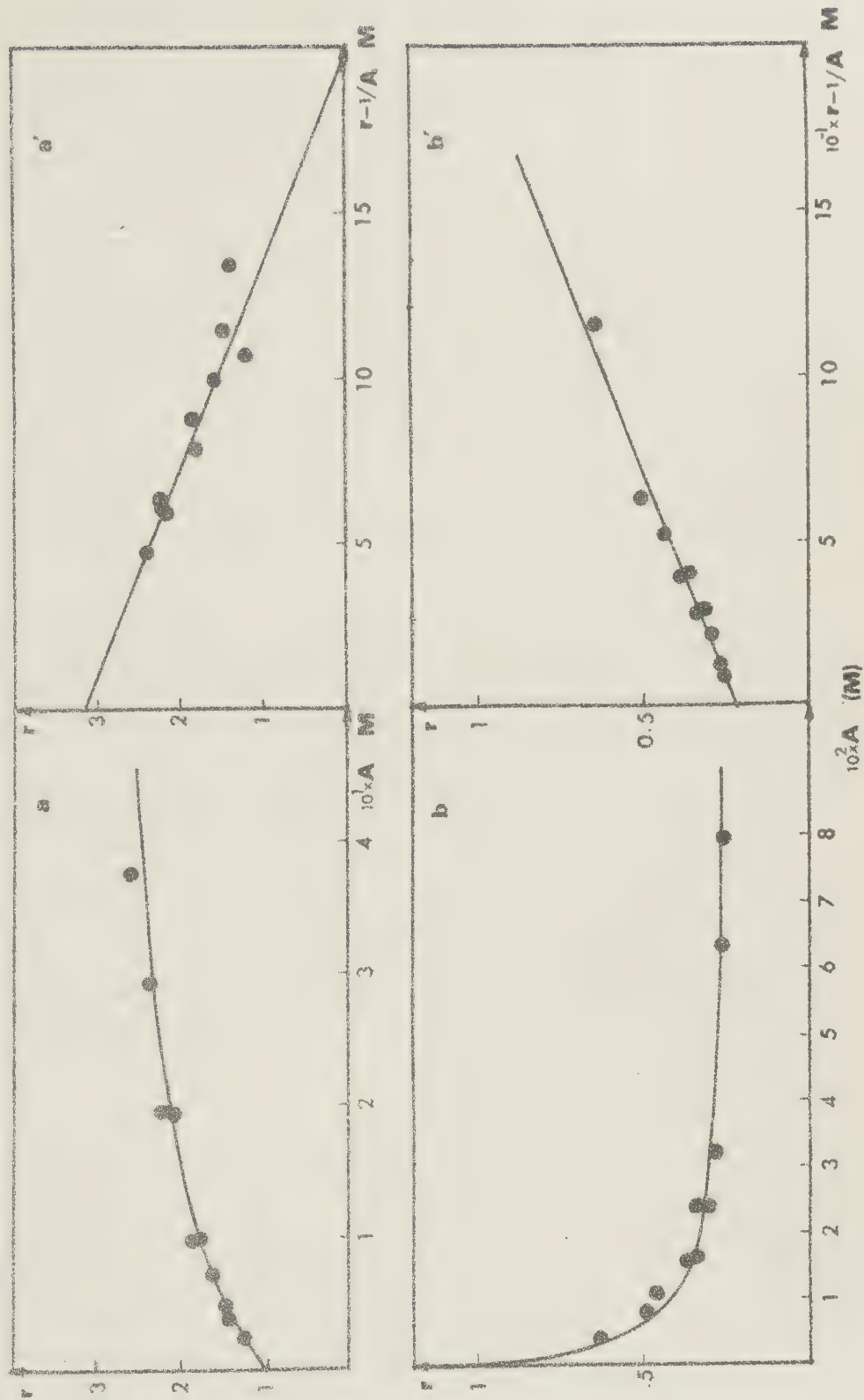
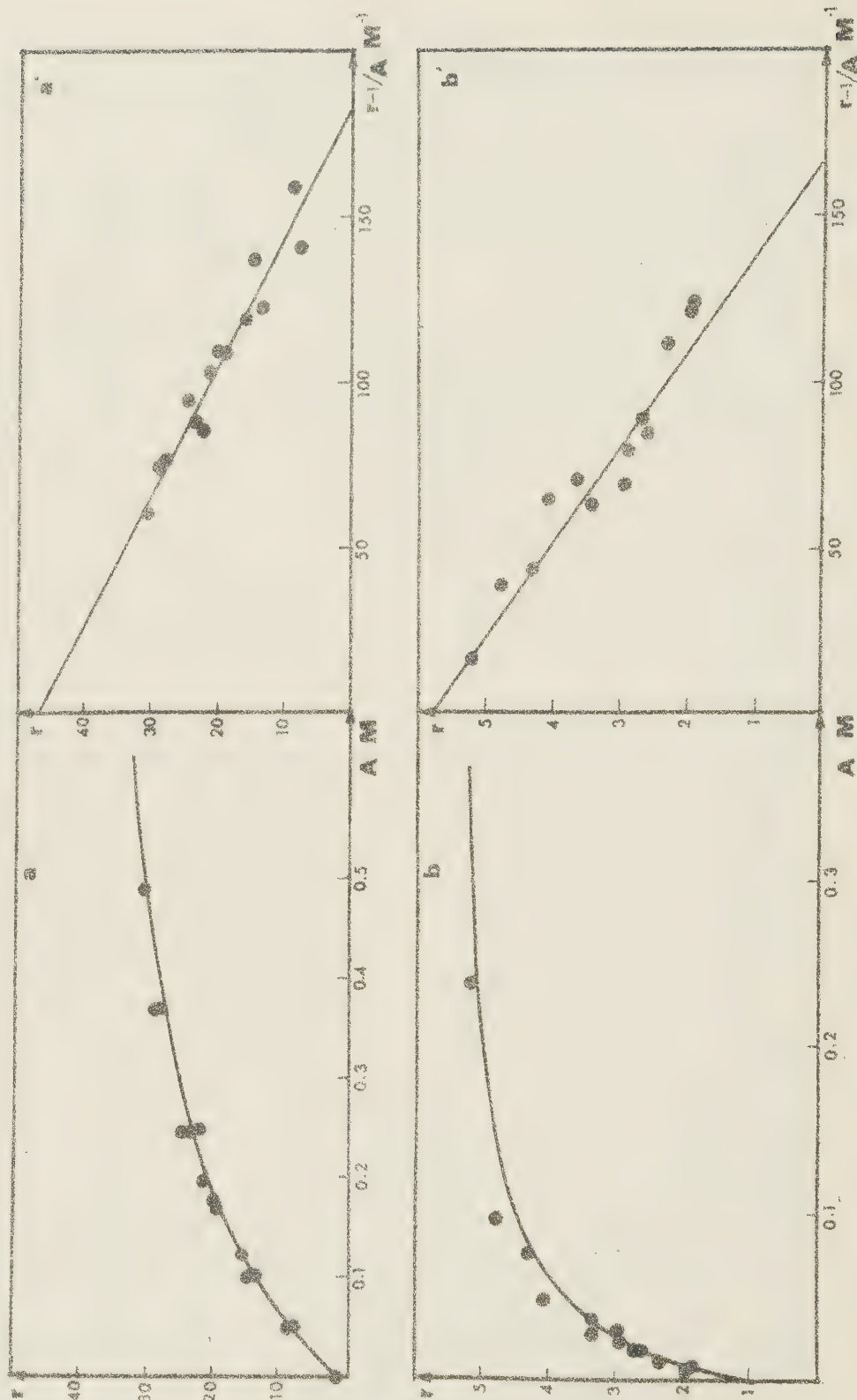


Figure 24 - Effets comparés du 2 aminohéptane (a) et du 1 aminohéptane (b) sur l'hydrolyse trypsique de l'AGPNE. Conditions : voir tableau 12. Les représentations linéaires de ces effets sont données en a' et b'. Le 2 aminohéptane active beaucoup plus la réaction dans ces conditions que le 1 aminohéptane.



La vitesse observée en présence d'amine peut se mettre sous la forme :

$$k_{app} = k_{app_0} \frac{1 + A/K_A^{**}}{1 + A/K_A^*} \quad (86)$$

équation dans laquelle k_{app_0} est la vitesse en l'absence d'amine A, K_A^* et K_A^{**} des constantes de dissociation apparentes; en posant $k_{app}/k_{app_0} = r$, r étant une *vitesse relative*, il vient :

$$r = - K_A^* \frac{r-1}{A} + r_m \quad (87)$$

avec $r_m = \frac{K_A^*}{K_A^{**}}$, qui est la valeur de la vitesse relative à saturation en amine.

Un exemple typique de cette représentation est donnée dans la figure 22. La signification des paramètres K_A^* et K_A^{**} sera donnée par la suite mais on peut indiquer dès maintenant que dans les conditions présentes ($S < K_m$) K_A^* est la constante de dissociation du complexe enzyme-amine EA postulé par Inagami (56).

L'analyse des données expérimentales a été effectuée au moyen du programme de calcul PS2a pondéré avec $w = 1/y^2$.

Il apparait dans le tableau 12 que *les ions alkylammonium de la série II activent beaucoup plus la réaction enzymatique que leurs homologues de la série I*. La cyclopropylamine et le 3 amino heptane sont également des activateurs. Seules la propylamine, la butylamine et la pentylamine inhibent l'hydrolyse trypsique de l'AGPNE dans ces conditions, mais l'inhibition observée est toujours *partielle* comme en témoigne la figure 23 dans le cas de la butylamine. La méthylamine n'a aucun effet sur k_{app} dans ces conditions.

b - DEPLACEMENT PAR LES AMINES DU pK DE L'IMIDAZOLE DU CENTRE ACTIF DANS L'ENZYME LIBRE.

Inagami (40) a observé en présence d'alkylamines et d'alkylguanidines un déplacement *important* du pK de l'imidazole du centre actif de l'ordre de -0.3 à -0.4 unités pH. Cet effet a également été trouvé dans ce travail en déterminant ce pK à différentes concentrations d'amines, avec une concentration en substrat de l'ordre de 2.10^{-4} soit $S \ll K_m$. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 13. L'évaluation de ces pK_m à partir des vitesses à différents pH a été effectuée au moyen du programme de calcul PS1b (figure 25). A partir de ces valeurs, il est possible de calculer la variation maximale du pK à saturation en amine.

T A B L E A U N° 13

Déplacement du pK de l'imidazole pK_{H(app)} dans l'enzyme libre en présence d'amine. Conditions : CaCl₂ 0,025 M, 25° C, Tampon MES ou TES 0,032 M. S = AGPNE $\approx 10^{-4}$ M. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

Amine	Concentration x 10 ² (M)	pK _{H(app)}
2 aminoheptane ^a	.00	6.83 (.04)
"	.40	6.84 (.01)
"	1.01	6.80 (.02)
"	1.27	6.75 (.03)
"	2.36	6.71 (.03)
"	4.83	6.69 (.01)
"	10.10	6.52 (.03)
"	19.10	6.43 (.02)
	.00 ^b	6.78 (.03)
	.00 ^{b,c}	7.00 (.07)
2 aminopentane	20.60 ^b	6.39 (.05)
2 aminoheptane	20.60 ^b	6.40 (.03)
éthylamine ^a	2.90	6.75 (.02)
	5.75	6.67 (.03)
	11.50	6.63 (.04)

a : force ionique constante, $\mu = 0,58$ M (NaCl).

b : force ionique constante, $\mu = 0,31$ (NaCl).

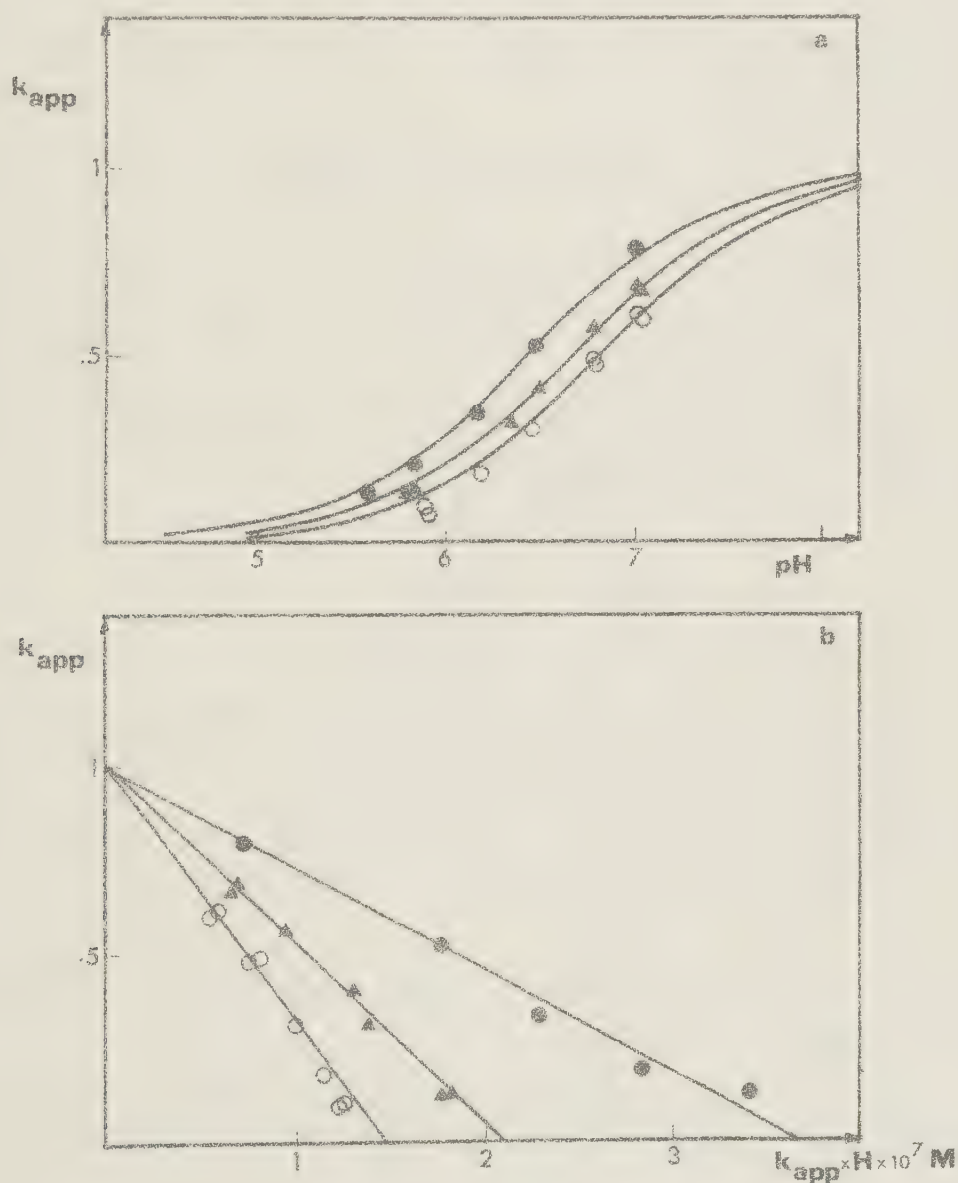
c : S = $3 \cdot 10^{-3}$ M, force ionique $\mu = 0,11$.

Figure 25 - Détermination du pK de l'imidazole en absence d'amine (O) et en présence d'éthylamine 0,0575 M (▲) ou de 2 aminoheptane 0,191 M (●). Conditions : voir tableau 13.

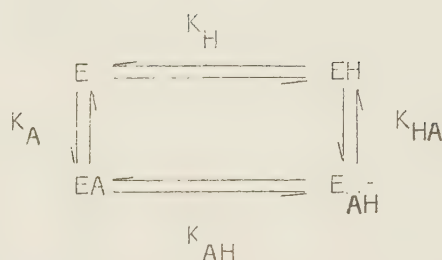
: représentation de la vitesse exprimée en unités arbitraires ($k_{app} \rightarrow 1$ lorsque $H^+ \rightarrow 0$) en fonction du pH. Les points sont expérimentaux, les courbes calculées à partir des valeurs données dans le tableau 13.

: représentation linéaire de k_{app} en fonction de $k_{app} \times H^+$, k_{app} étant de la forme

$$k_{app} = \frac{k_{app_0}}{1 + H^+/K_{A(app)}}$$



Sur la base du schéma carré :



la valeur apparente du pK de l'imidazole à une concentration donnée d'amine A peut s'écrire :

$$K_H(\text{app}) = K_H \frac{1 + A/K_A}{1 + A/K_{HA}} \quad \text{Eq (88)}$$

K_H étant la constante d'ionisation de l'imidazole en l'absence d'amine et K_A et K_{HA} les constantes de dissociation des complexes enzyme-amine EA et EAH formés respectivement avec l'enzyme libre déprotoné ou protoné sur son imidazole réactif.

En utilisant pour K_{HA} la valeur du paramètre K_A^* déterminée à pH 4.95, c'est à dire lorsque l'enzyme est presque entièrement protoné sur son imidazole réactif, il est possible de linéariser l'expression 88 :

$$K_H(\text{app}) (1 + A/K_{HA}) = K_H (1 + A/K_A) \quad \text{Eq (89)}$$

Conformément à cette équation, la représentation graphique de $K_H(\text{app}) (1 + \frac{A}{K_{HA}})$ en fonction de A est sensiblement linéaire (figure 26 a) et permet ainsi de calculer K_A pour l'éthylamine et le 2 aminoheptane. A partir de cette valeur de K_A , on peut en déduire la valeur du pK de l'imidazole à saturation en amine en utilisant la relation $K_A/K_{HA} = K_H/K_{AH}$, évidente d'après le schéma précédent. On trouve ainsi $\Delta pK = pK_{AH} - pK_H = -0.69$ pour les 2 amino heptane et $\Delta pK = -0.32$ pour l'éthylamine.

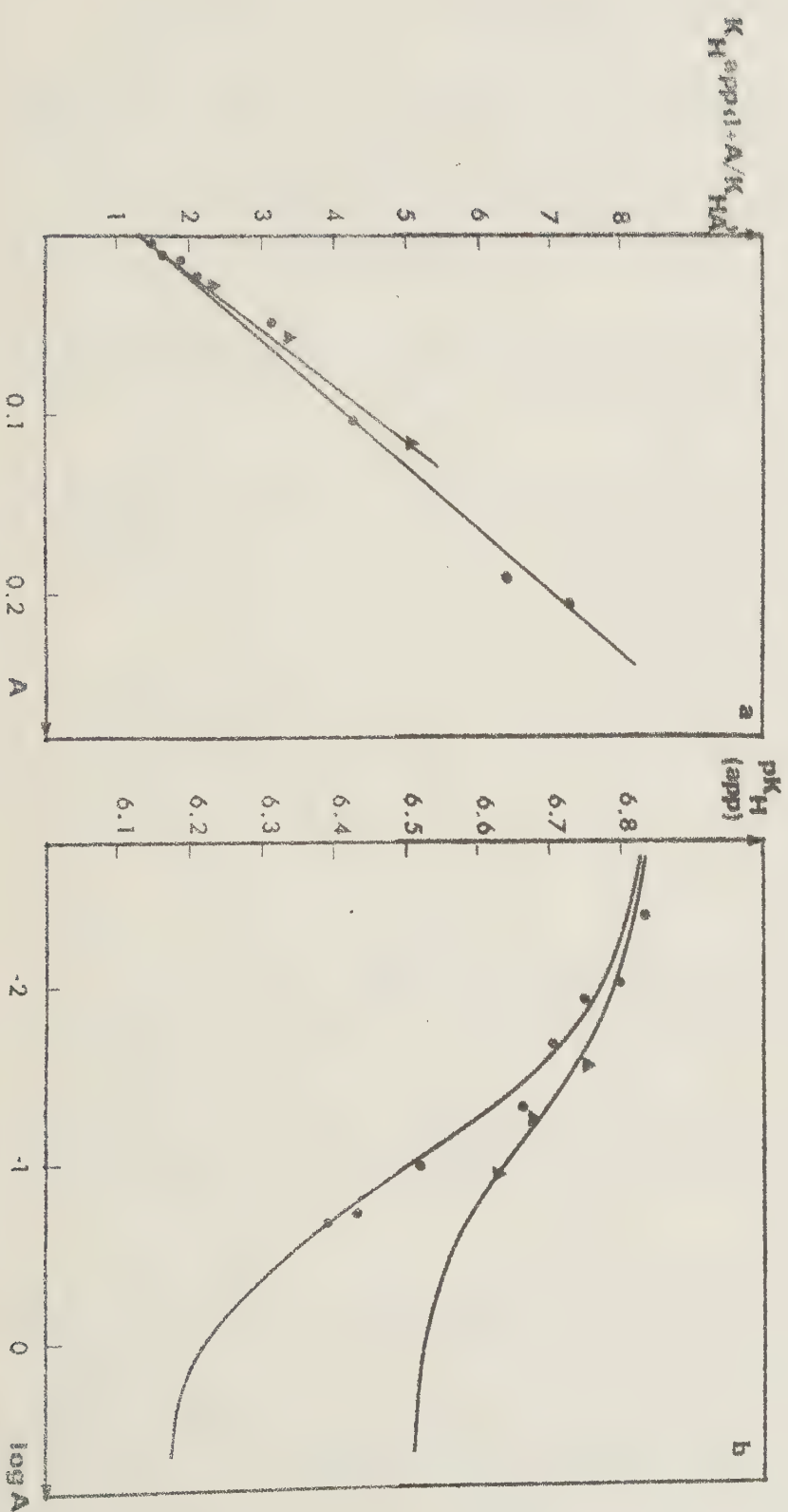
Ces valeurs rendent compte des variations de $pK_{H(\text{app})}$ en fonction de la concentration en amine (figure 26 b).

Il est évident que ce déplacement du pK de l'imidazole vers les pH acides ne peut expliquer complètement les effets d'activation observés à pH 4.95.

Figure 26 - Déplacement du pK de l'indazole en présence de 2 aminoheptane (●) et d'éthylamine (▲).
Conditions : voir tableau 13.

a : Représentation de $K_{H(app)} (1 + A/K_{HA})$ en fonction de A ; linéarisation de l'équation 86 (voir texte).

b : Variation de $pK_{H(app)}$ en fonction de $\log A$; les points sont expérimentaux, les courbes sont calculées à partir de l'équation 88, et de $pK_H = 6,83$ avec $\Delta pK = -0,69$ dans le cas du 2 aminoheptane et $\Delta pK = -0,32$ dans le cas de l'éthylamine.



c - EFFETS DLS AMINES SUR LES PARAMETRES k_{cat} et K_m DE L'AGPNE.

A pH 4.95, on constate que toutes les amines testées augmentent simultanément les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE (voir figure 27 et tableau 14). Dans le cas de la 1 butylamine, l'augmentation de K_m est plus importante que celle de k_{cat} , ce qui explique l'inhibition partielle observée pour $S < K_m$. L'augmentation de K_m est également importante dans le cas du 1 amino heptane.

Une étude de l'influence de la concentration en 2 aminheptane sur les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE a été entreprise vers pH 6.3 et à 2 forces ioniques différentes ^a.

Les données numériques sont rassemblées dans le tableau 15 (figure 28) elles ont été analysées en ce qui concerne le paramètre k_{cat} au moyen du programme de calcul PS2 a qui donne $K_A^* = 0.55 \pm 0.18$ ^b et $r_m = 221 \pm 59$ ^{cat} pour $\mu = 0.58$ et $K_A^* = 0.46 \pm 0.20$ ^b et $r_m = 200 \pm 75$ pour $\mu = 0.25$.

L'effet sur k_{cat} est donc considérable puisqu'il révèle une activation de l'ordre de 200 fois sur ce paramètre. Le fait que les 2 séries de valeurs de k_{cat} en fonction de la concentration en 2 aminheptane (variant de 0 à 0.14 M dans un cas et de 0 à 0.4 M dans l'autre) donnent des valeurs de K_A^* et de r_m voisines indique qu'une seule molécule d'amine est impliquée dans ce phénomène pour la zone de concentration étudiée.

d - EFFETS DES AMINES SUR L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'AGEE.

L'analyse cinétique de l'hydrolyse trypsique de l'AGEE a été effectuée à pH 7 au moyen de la méthode potentiométrique à pH constant (produit P_2 titré).

Pour une concentration de substrat de l'ordre de 0.2 M ($S < K_m$) l'effet de l'ethylamine et du 2 aminheptane est correctement décrit par l'équation 86 (figure 29). Les valeurs correspondantes des paramètres r_m et K_A^* sont données

^a Il s'est avéré nécessaire de maintenir la force ionique du milieu constante en tenant compte de la contribution des ions alkylammonium présents dans le milieu réactionnel. En effet, à pH 4.9 pour $S < K_m$, et pour certaines amines, la valeur de r_m trouvée est plus forte lorsque la force ionique n'est pas maintenue constante, ce qui pourrait indiquer un effet de la force ionique sur le phénomène d'activation, k_{app} augmentant au maximum de 30% dans ces conditions lorsque la force ionique passe de 0.1 à 0.6 M. Inagami rapporte une augmentation de K_A avec la force ionique du milieu (40). En ce qui concerne cependant l'effet du 2 aminheptane sur le paramètre k_{cat} d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE à pH 6.3, les valeurs de K_A^* et de r_m trouvées à 2 forces ioniques différentes (0.25 et 0.58) sont voisines.

b : M

T A B L E A U N° 14

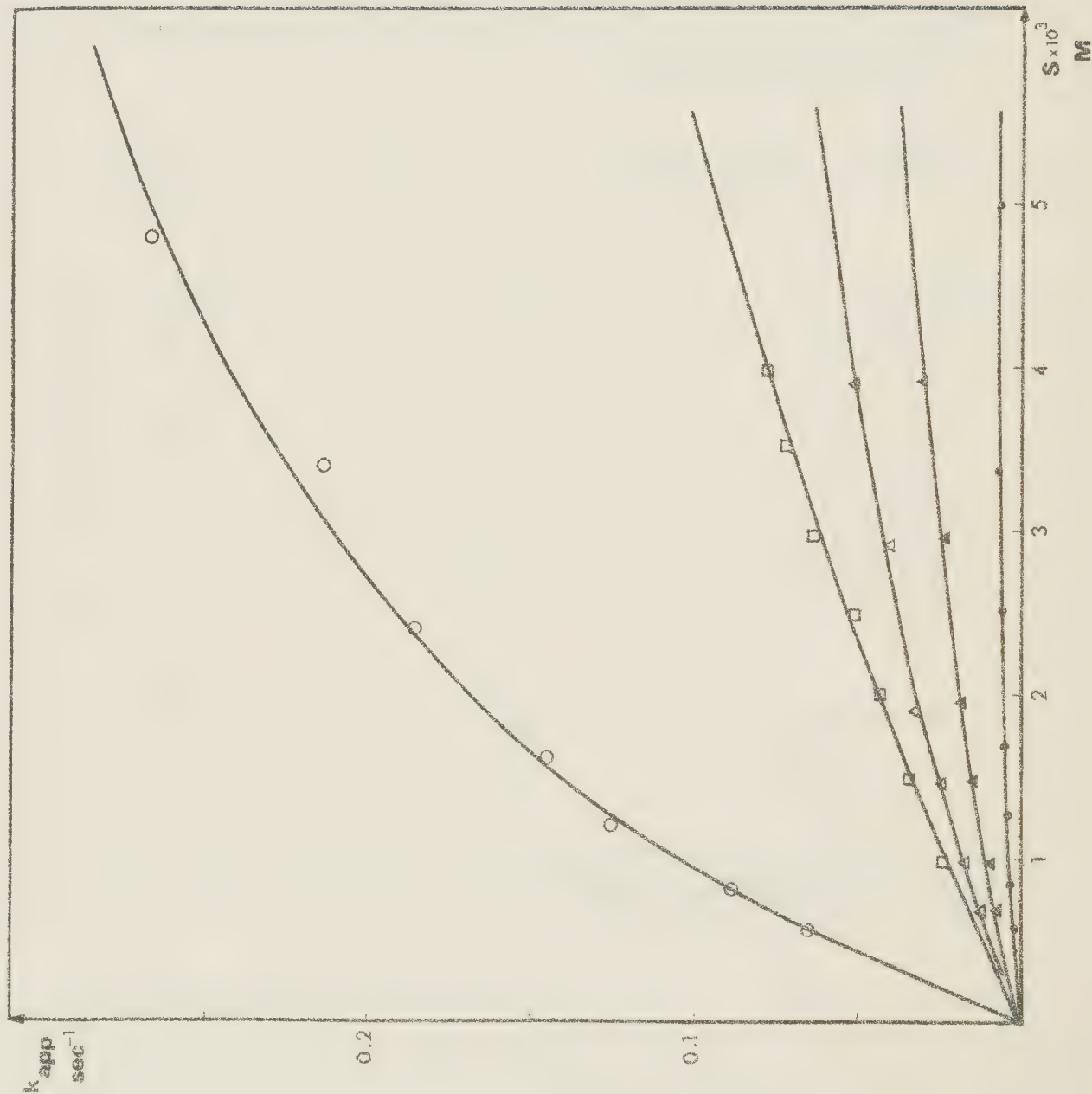
Effet des amines sur les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE, $\mu = 0,25$ (NaCl), $CaCl_2$ 0,025 M, 25°. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

Amine	Concentration $\times 10^1$ (M)	$k_{cat} \times 10^2$ (sec ⁻¹)	K_m (mM)
	.00 ^a	.96 (.03)	1.43 (.10)
éthylamine	.94	12.90 (1.20)	6.04 (.80)
1-butylamine	.03	1.66 (.14)	5.32 (.68)
"	.37	4.60 (.66)	24.00 (4.00)
2-butylamine	1.15	9.10 (1.50)	8.00 (1.80)
1-aminoheptane	.70	35.90 (9.70)	14.30 (4.60)
2-aminoheptane	1.41	43.30 (1.90)	3.12 (.26)
	.00 ^b	9.40 (.17)	1.67 (.13)
2-aminoheptane	1.44	307.00 (33.00)	2.81 (.51)

a pH 4,90 tampon acétate 0,032 M

b pH 6,04 tampon MES 0,032 M.

Fig. 27 - Effet des amines sur les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse tryptique de l'AGNE. O 2 aminohéptane ; Δ 1 aminohéptane ; Δ 1 éthylamine ; $\blacktriangle$ 2 butylamine ; $\bullet$ sans amine. Conditions voir tableau 14. Les points sont expérimentaux, les courbes calculées à partir de l'éq. 3 et des valeurs de K_m et de k_{cat} données dans le tableau 14.



T A B L E A U N° 15

Effet du 2-aminoheptane sur les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE, 25°, $CaCl_2$ 0,025 M. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

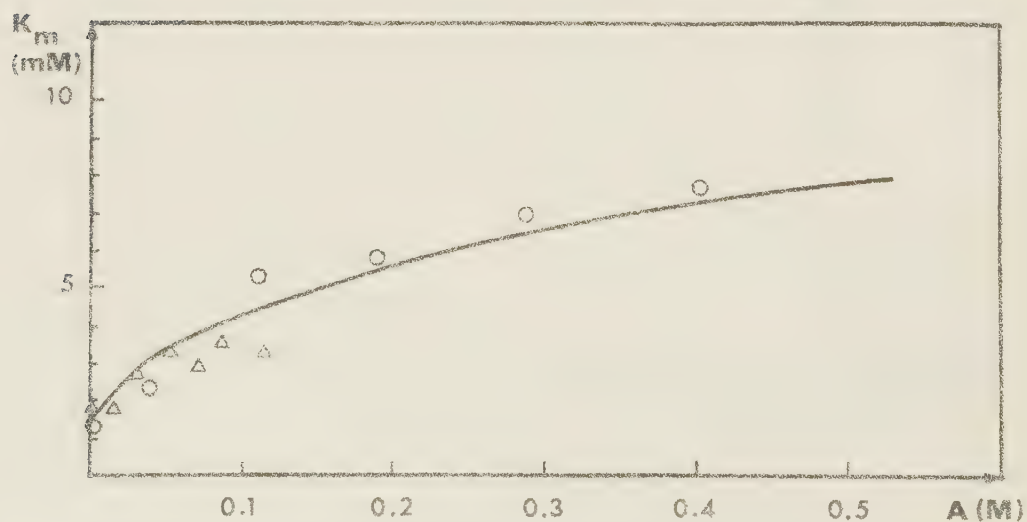
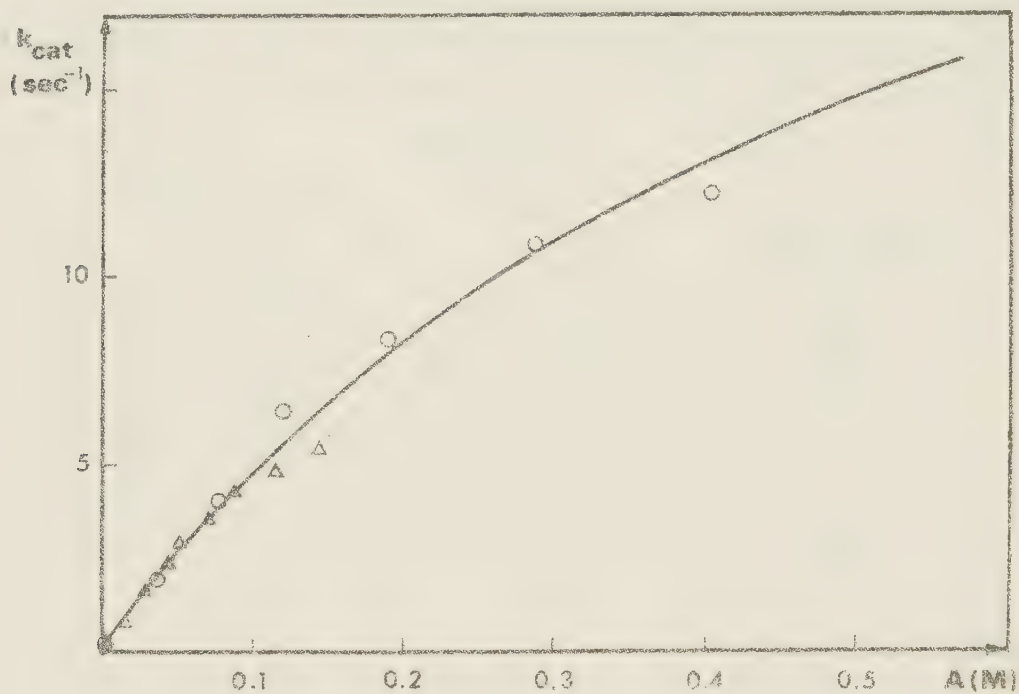
Concentration $\times 10^1$ (M)	k_{cat} (sec^{-1})	K_m^c (mM)
.00 ^a	.12 (.005)	1.85 (.16)
.143	.74 (.03)	1.78 (.19)
.29	1.58 (.04)	2.73 (.16)
.43	2.14 (.12)	2.39 (.24)
.53	2.83 (.13)	3.26 (.27)
.72	3.45 (.37)	2.96 (.54)
.86	4.16 (.21)	3.54 (.31)
1.15	4.79 (.27)	3.24 (.30)
1.44	5.39 (.22)	3.58 (.25)
.00 ^b	.14 (.00)	1.32 (.15)
.38	1.90 (.08)	2.33 (.19)
.77	3.98 (.31)	3.81 (.46)
1.20	6.45 (.72)	5.31 (.83)
1.91	8.35 (.45)	5.77 (.43)
2.87	10.90 (.72)	6.91 (.64)
4.05	12.20 (2.38)	7.64 (2.07)

a pH 6,26 ; μ = 0,25 (NaCl) ; Tampon MES 0,032 M

b pH 6,31 ; μ = 0,58 (NaCl) ; Tampon MES 0,032 M

c Ce paramètre est difficile à évaluer à ce pH, étant donné l'hydrolyse spontanée du substrat importante.

Figure 28 - Effet du 2 aminoheptane sur les paramètres k_{cat} et K_m d'hydrolyse tryptique de l'AGPNE à 2 forces ioniques différentes $\mu = 0,58$ (O) et $\mu = 0,25$ (Δ). Conditions voir tableau 15. Les points sont expérimentaux, les courbes calculées à partir des équations 98, 100, et des valeurs données dans le texte. Pour le K_m de l'AGPNE, on a pris $\beta/K_A'' = 400$, $\alpha/K_A' = 200$, $K_{A(app)} = 0,1$, $K_{A''(app)} = 0,5$ dans l'équation 100.



dans le tableau 17. Les valeurs obtenues pour l'éthylamine sont voisines de celles rapportées par Inagami (40, 56) dans des conditions légèrement différentes.

Par ailleurs l'introduction de 2 aminoheptane dans le milieu réactionnel diminue nettement la valeur de K_m tout en augmentant la valeur de k_{cat} comme en témoignent la fig. 30 et les données du Tableau 16.

On peut noter que la valeur extrêmement élevée du K_m de l'AGEE révèle la faible importance des interactions enzyme substrat dans ce cas. La diminution importante du K_m lorsqu'on passe à l'AGPNE est certainement due en grande partie à une augmentation de k_2 sur la base du schéma 1, conformément à ce que nous avons indiqué au début de ce chapitre.

e - RESULTATS OBTENUS AVEC LE PARANITROPHENYLACETATE ET LA BENZOYLGLYCINE-ETHYLESTER.

1) Paranitrophénylacétate.

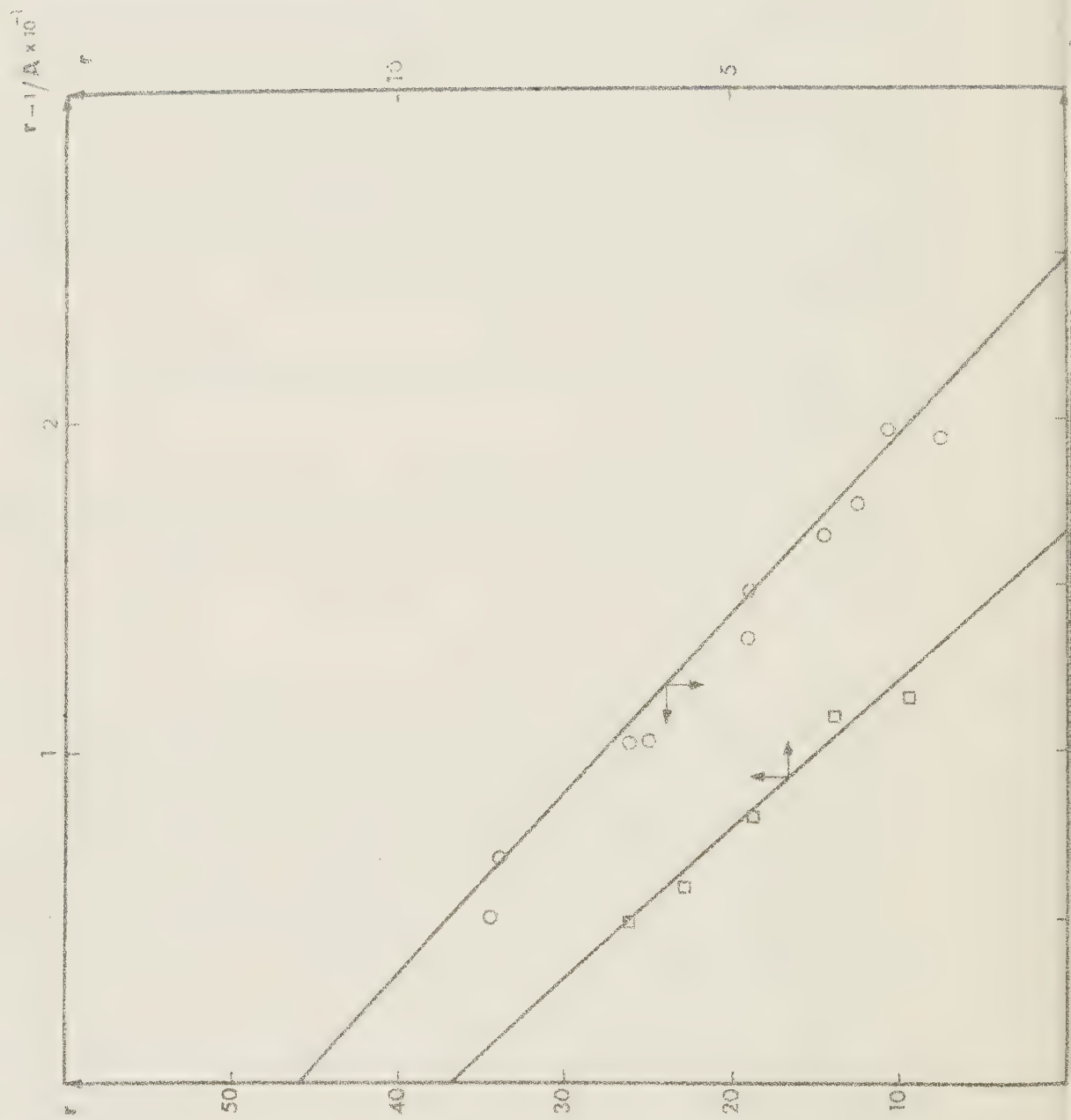
L'effet des amines sur l'hydrolyse trypsique de ce substrat a été analysée à partir de la vitesse d'apparition du produit P_1 (paranitrophénol) à l'état pré-stationnaire mesurée au moyen de la méthode spectrophotométrique et décrite à partir de l'équation 32 :

$$P_1 = \Pi (1 - e^{-kt}) + k_{ss} t$$

où k est la constante de vitesse à l'état pré-stationnaire et k_{ss} la vitesse à l'état stationnaire. Le paramètre k a été évalué en utilisant le programme de calcul PS2c qui révèle que la formule précédente permet de rendre compte de façon très exacte de la forme des cinétiques d'apparition du produit P_1 , même en présence d'amine. Le jet de paranitrophénol Π n'est pas modifié en présence d'amine : on trouve ainsi $\Pi = 0,0388 \pm 0,0017$ en unités de densité optique à 347,5 m μ , pour 9 expériences effectuées en présence ou en absence d'amine avec $E_o = 216$ g/ml ce qui indique que K_m n'est pas sensiblement augmenté et que k_2 reste très supérieur à k_3 en présence d'amine. En conséquence l'effet activateur observé ici sur le rapport $k_2/K_s (= k/S)$ doit être sensiblement identique sur le paramètre k_3 (voir équations 32, 33).

La variation du paramètre k en fonction de la concentration en amine (figure 31) est décrite par l'équation 86 et a été analysée au moyen du programme de calcul PS2a. Les valeurs correspondantes des paramètres K_A^* et r_m pour les 3 amines testées (2 aminoheptane, 1 aminoheptane et cyclopropylamine) sont données dans le tableau 19. Les valeurs obtenues pour la constante K_A avec l'éthylamine et la cyclopropylamine sont compatibles avec celles trouvées pour l'AGPNE dans les mêmes conditions, compte tenu de la faible reproductibilité des résultats expérimentaux et des effets activateurs relativement peu importants dans ce cas. Ces derniers d'ailleurs peuvent être dus simplement à la diminution du pK de l'imidazole observée en présence d'amine. Par contre la valeur de K_A obtenue avec le 2 aminoheptane est très différente de celle donnée dans le cas de l'AGPNE.

Figure 29 - Effet de l'éthylène ($\square$) et du 2-propanestane (O) sur l'hydrolyse
 trypsique de l'AGEE. Conditions : voir tableau 17. Représentation linéarisée don-
 née par l'équation 87.



T A B L E A U N ° 16

Effet du 2-aminoheptane sur les paramètres cinétiques de l'AGEE
à pH 7,0, 25°, $\mu = 0,58$ (NaCl), CaCl_2 0,025 M

Amine	Concentration $\times 10^1$ (M)	$k_{\text{cat}} \times 10^2$ (sec^{-1})	K_m (M)
---	.00	1.90 (.10)	.88 (.08)
2 aminoheptane	.51	15.70 (.80)	.44 (.03)
2 aminoheptane	1.24	23.50 (1.50)	.41 (.04)

T A B L E A U N ° 17

Effet du 2-aminoheptane et de l'éthylamine sur l'hydrolyse trypsique
de l'AGEE pour $S = 0,195$ M. Autres conditions : voir tableau 16.

Amine	r_m	$K_A^* \times 10^2$ (M)	r_m/K_A^* (M^{-1})
éthylamine	.9.18 (.49)	5.52 (.57)	166 (12.20)
2-aminoheptane	45.80 (1.91)	9.20 (.56)	499 (19.90)

Figure 30 - Effet du 2 aminoheptane sur les paramètres K_{cat} et K_m d'hydrolyse tryptique de l'AGEE. Conditions : voir Tableau 16. Représentation d'Eadie,

● A = 0,124 M ; ▲ A = 0,051 M ; ○ : sans amine.

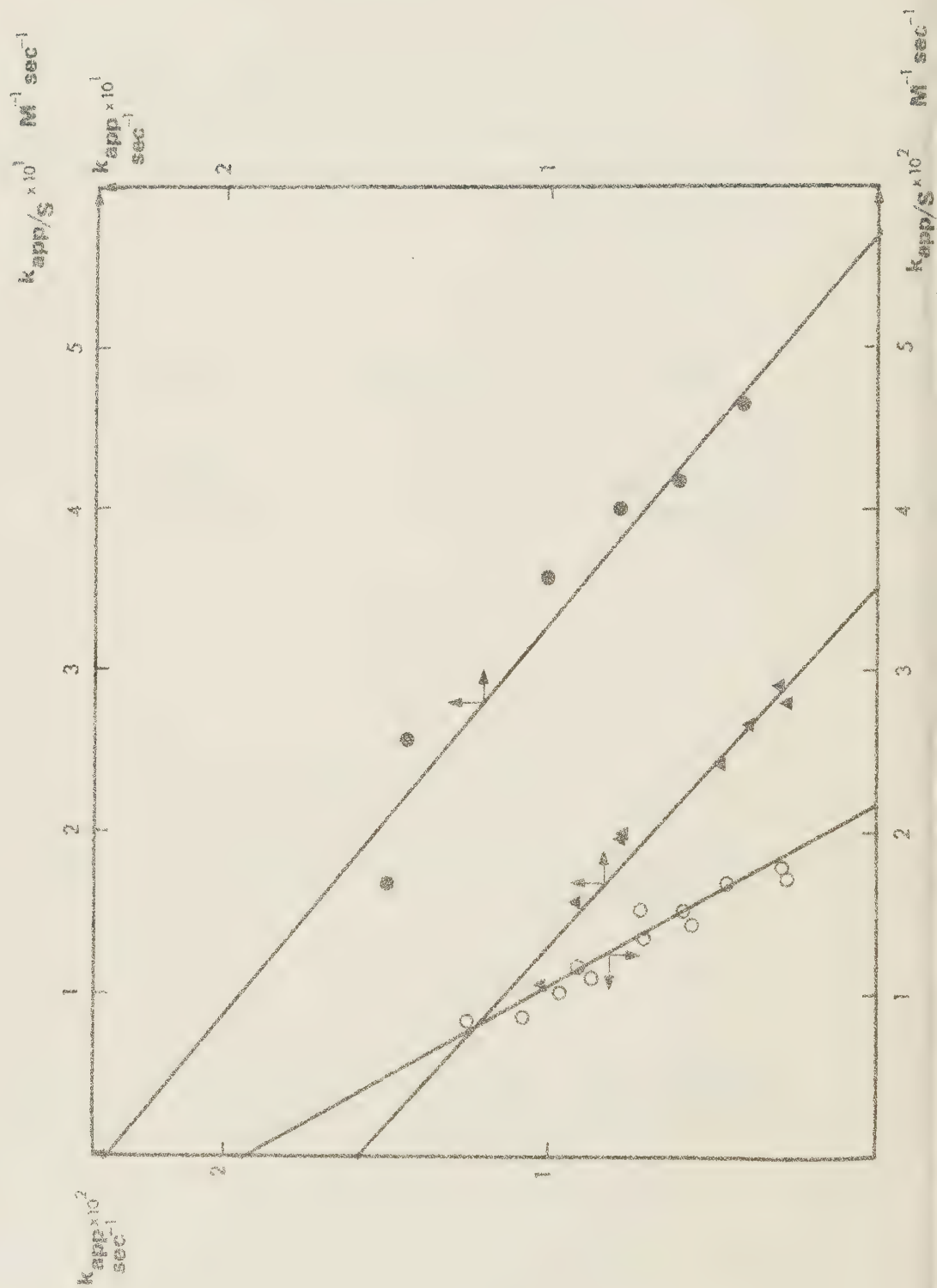


TABLEAU N° 18

Effet des amines sur l'hydrolyse trypsique du BGEE, à pH 7, 25°, $\mu = 0,425$ (NaCl), $\text{CaCl}_2 = 0,025 \text{ M}$, $S = 0,0165 \text{ M}$.

Amine	r_m	$K_A^* \times 10^2 (\text{M})$	$r_m / K_A^* (\text{M}^{-1})$
éthylamine	.25 (.07)	6.14 (1.61)	4.10 (2.10)
2-aminoheptane	.39 (.04)	7.80 (2.50)	5.00 (1.90)
2-aminooctane	.39 (.01)	6.24 (.27)	6.20 (.37)

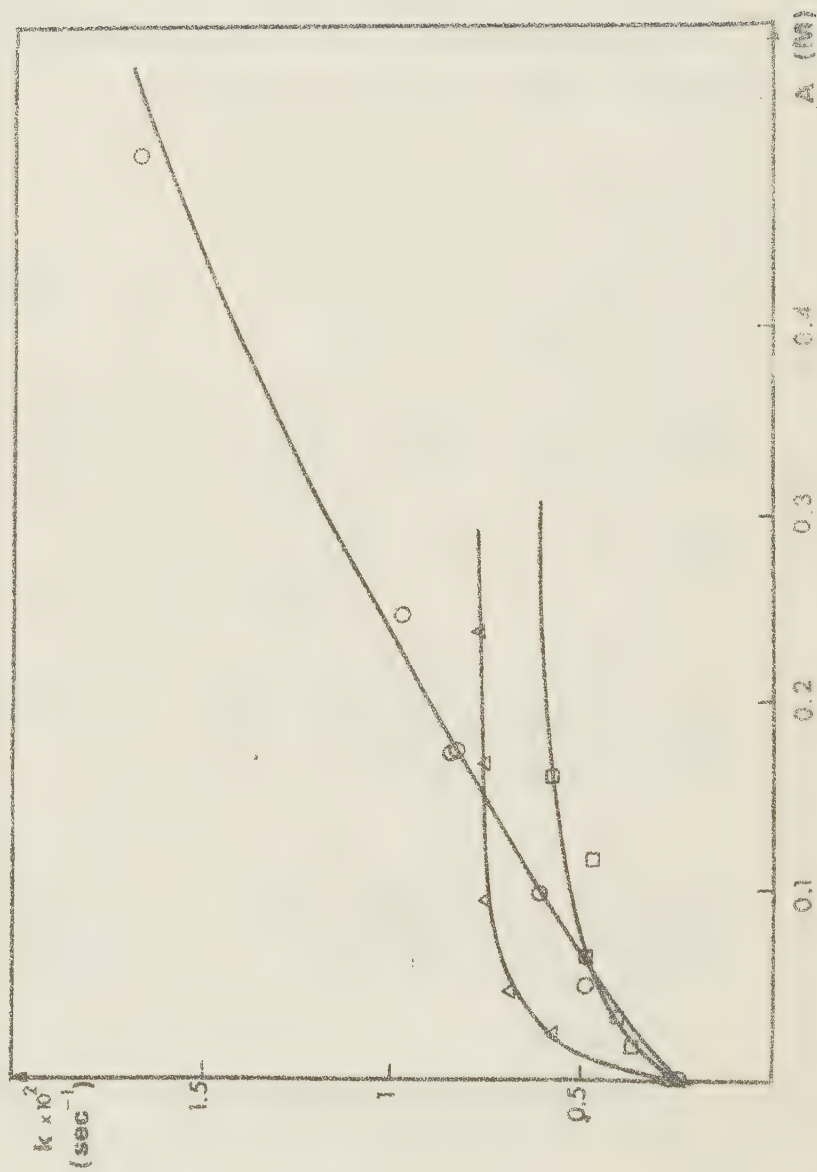
TABLEAU N° 19

Effet des amines sur l'hydrolyse trypsique du paranitrophénylacétate à l'état préstationnaire à pH 4,95, tampon acétate 0,032 M, $\mu = 0,58$ (NaCl), CaCl_2 0,025M, 25°, $S = 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

	r_m	$K_A^* \times 10^2 (\text{M})$	$r_m / K_A^* (\text{M}^{-1})$
éthylamine	8.60 (.06)	6.10 (1.50)	42.80 (8.50)
cyclopropyl-	3.05 (.10)	1.61 (.29)	190.00 (10.00)
2-aminoheptane ^a	~ 20	~ 140	

^a Ces valeurs n'ont sans doute pas une grande signification, elles sont seulement données à titre indicatif.

Figure 31 - Effet du 2 aminoheptane (O), de la cyclopropylamine (Δ) et de l'éthylamine ($\square$) sur l'hydrolyse tryptique du paranitrophénylacétate à l'état pré-stationnaire. Conditions : voir tableau 18. Les points sont expérimentaux, les courbes calculées au moyen de l'équation 85 et des valeurs données dans le tableau 18.



2) Benzoylglycine éthylester.

L'analyse cinétique de l'hydrolyse trypsique de ce substrat a été effectuée en utilisant la méthode potentiométrique à pH constant ou la méthode balistique aux faibles concentrations de substrat. Les valeurs de k_{cat} et de K_m sont respectivement de $(5,05 \pm 0,84) \cdot 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ et de $(5,6 \pm 1,2) \cdot 10^{-2} \text{ M}$ pour ce substrat. On peut noter que cette valeur de K_m est beaucoup plus faible que celle obtenue pour l'AGEE, parallèlement d'ailleurs la solubilité du BGEE décroît beaucoup par rapport à celle de l'AGEE (15).

On observe pour ce substrat avec $S < K_m$ une légère *inhibition partielle* en présence d'éthylamine, de 2 aminoheptane et de 2 aminooctane ($r_m < 1$) (voir tableau 18 et figure 32). Par contre avec la butylamine, l'inhibition observée est *totale* ($r_m = 0$), la valeur de $K_I = 1,15 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ obtenue est voisine de celle que trouve Inagami (61) pour l'inhibition compétitive de substrats spécifiques.

II - INTERPRETATION CINETIQUE ET DISCUSSION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.

a - SCHEMA CINETIQUE.

Le schéma cinétique qui permet d'interpréter nos résultats expérimentaux est une généralisation de celui proposé par Inagami (56) en tenant compte de l'ionisation de l'histidine du centre actif et de deux complexes intermédiaires enzyme substrat ES et ES' (complexe de Michaelis et acylenzyme). Ce schéma cinétique n° 6 est donné à la page suivante. Les étapes d'adsorption du substrat et de l'amine sur l'enzyme sont supposées rapides devant les étapes catalytiques (quasi-équilibre). En utilisant l'approximation de l'état stationnaire, il vient pour l'équation de vitesse michaelienne (eq. 3) :

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 \left(1 + \frac{\alpha A}{K'_A}\right) \left(1 + \frac{\beta A}{K''_A}\right)}{k_2 \left(1 + \frac{\alpha A}{K'_A}\right) \left(1 + \frac{A}{K''_A} \left(1 + \frac{H}{K''_{AH}}\right) + \frac{H}{K''_H}\right) + k_3 \left(1 + \frac{\beta A}{K''_A}\right) \left(1 + \frac{A}{K'_A} \left(1 + \frac{H}{K'_{AH}}\right) + \frac{H}{K'_H}\right)} \quad \text{Eq. (90)}$$

$$K_m = K_s \frac{k_3 \left(1 + \frac{\beta A}{K''_A}\right) \left(1 + \frac{A}{K_A} \left(1 + \frac{H}{K_{AH}}\right) + \frac{H}{K_H}\right)}{k_2 \left(1 + \frac{\alpha A}{K'_A}\right) \left(1 + \frac{A}{K''_A} \left(1 + \frac{H}{K''_{AH}}\right) + \frac{H}{K''_H}\right) + k_3 \left(1 + \frac{\beta A}{K''_A}\right) \left(1 + \frac{A}{K'_A} \left(1 + \frac{H}{K'_{AH}}\right) + \frac{H}{K'_H}\right)} \quad \text{Eq. (91)}$$

Une première approximation consiste à admettre que le déplacement du pK de l'imidazole par l'amine est le même au niveau de chaque complexe intermédiaire et que le pK de l'imidazole n'est pas déplacé dans ces complexes en l'absence d'amine par rapport à sa valeur dans l'enzyme libre. Soit :

Figure 32 - Effet de l'éthylamine (Δ) et du 2 aminohéptane ($\bullet$) sur l'hydrolyse tryptique de la BGEE. Conditions : voir tableau 19. Les points sont expérimentaux, les courbes sont calculées à partir de l'équation 38 et des valeurs du tableau 13.

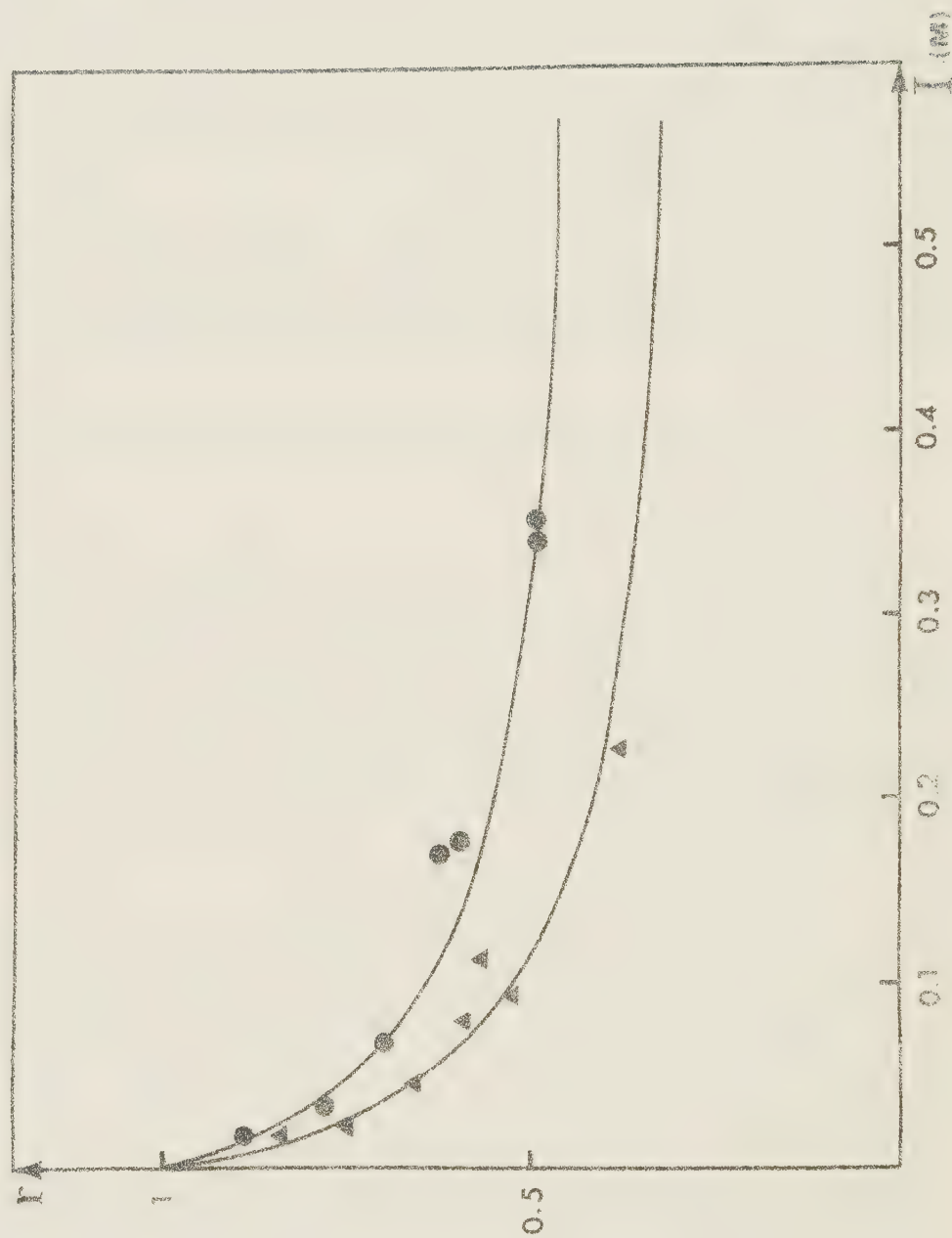
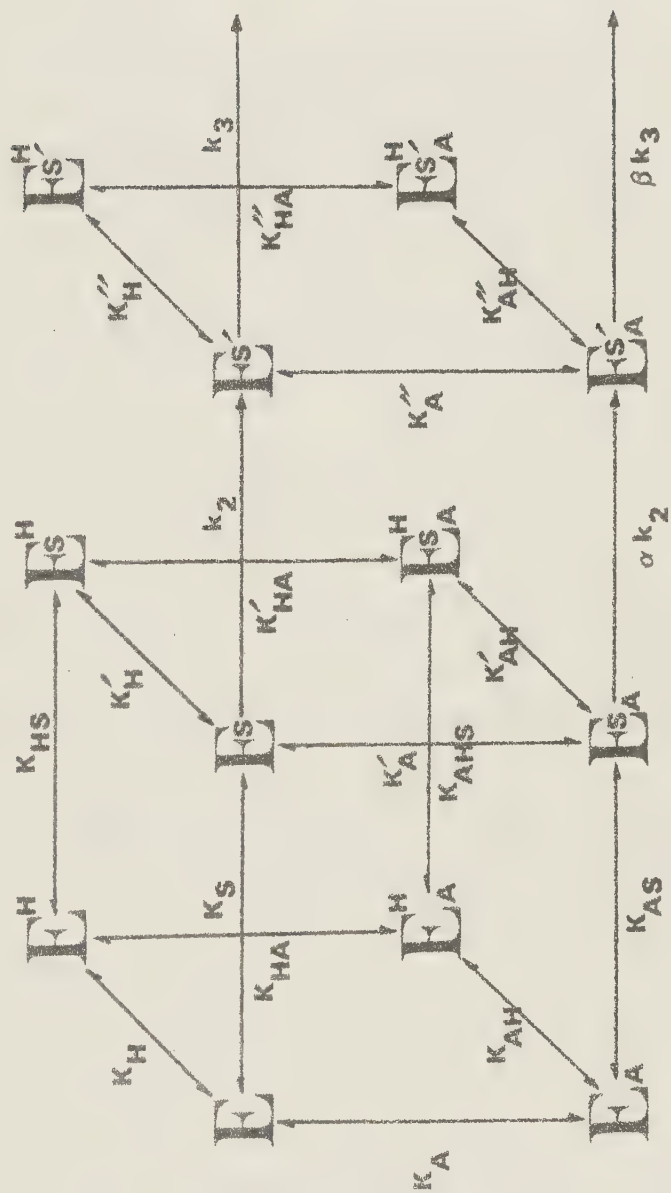


Schéma cinétique 6 - Schéma cinétique décrivant l'hydrolyse tryptique de substrats aspécifiques en présence d'amine et en tenant compte de l'ionisation de l'imidezole du centre actif.



$$K_H = K'_H = K''_H \quad (\text{Eq. 92})$$

et

$$K_{AH} = K'_{AH} = K''_{AH} \quad (\text{Eq. 93})$$

Cette approximation est justifiée du fait que dans le cas de l'AGEE le K_m n'est pas modifié sensiblement par des variations de pH ($K_H = K'_H$) (2) et de même dans le cas de l'AGPNE ($K_H = K''_H$) si on considère les valeurs de K_m données dans les tableaux 14 et 15. Etant donné les difficultés expérimentales rencontrées aux pH élevés avec $S \simeq K_m$ (hydrolyse spontanée du substrat importante dans ces conditions), la différence entre les valeurs de pK déterminées pour $S \simeq K_m$ et $S \ll K_m$ n'est pas très significative (voir tableau 13).

Par ailleurs, compte tenu de la variation de $K_{A(\text{app})}$ avec le pH, K_m à une concentration donnée d'amine (2 aminoheptane) ne varie pas de façon significative en fonction du pH (voir tableaux 14 et 15). Ceci nous permet de considérer la relation 93 comme approximativement vérifiée en première analyse^a. En définissant :

$$K_{A(\text{app})}^i = K_A^i \frac{1 + H/K_H^i}{1 + H/K_{AH}^i} \quad (\text{Eq. 94})$$

l'indice i correspondant aux 3 états possibles de l'enzyme (enzyme libre : pas d'indice, complexe de Michaelis, indice ' et acylenzyme indice ''), on peut ainsi calculer les valeurs de K_A^i au pH de référence choisi égal à 7, en utilisant les valeurs de K_H et de K_{AH} pour l'enzyme libre, compte tenu des équations précédentes (Eq. 92 et 93).

D'autre part, l'étape d'acylation est limitante pour l'AGEE et l'étape de désacylation est limitante pour l'AGPNE : il vient donc respectivement pour chacun de ces substrats :

$$\text{AGEE} : k_2 \ll k_3$$

$$k_{\text{cat}} = k_{2(\text{app})} \frac{1 + \alpha A/K'_A}{1 + A/K'_{A(\text{app})}} \quad (\text{Eq. 95})$$

$$\text{avec} \quad k_{2(\text{app})} = \frac{k_2}{1 + H/K'_H} \quad (\text{Eq. 96})$$

^aCette approximation est certainement très grossière. Cependant elle ne nous servira par la suite qu'à ramener des données de pH 6,3 à pH 7, pH de référence. Il est évident qu'un choix différent de pK''_{AH} ne modifierait pas sensiblement les conclusions de cette étude.

et

$$K_m = K_s \frac{1 + H/K_H}{1 + H/K'_H} \frac{1 + A/K_{A(app)}}{1 + A/K'_{A(app)}} = K_s \frac{1 + A/K_{A(app)}}{1 + A/K'_{A(app)}} \quad (\text{Eq. 97})$$

, compte tenu de l'équation 92 .

$$\text{AGPNE : } k_3 \ll k_2$$

$$k_{cat} = k_{3(app)} \frac{1 + \beta A/K''_A}{1 + A/K''_{A(app)}} \quad (\text{Eq. 98})$$

avec

$$k_{3(app)} = \frac{k_3}{1 + H/K''_H} \quad (\text{Eq. 99})$$

et

$$K_m = K_s \frac{k_3 (1 + \beta A/K''_A) (1 + A/K_{A(app)})}{k_2 (1 + \alpha A/K'_A) (1 + A/K''_{A(app)})} \quad (\text{Eq. 100})$$

Pour le rapport k_{cat}/K_m , identique dans les deux cas :

$$k_{cat}/K_m = \frac{k_{2(app)}}{K_s} \frac{1 + \alpha A/K'_A}{1 + A/K_{A(app)}} \quad (\text{Eq. 101})$$

Les paramètres r_m , K_A^* et K_A^{**} précédemment définis à partir de l'équation 86 s'écrivent alors :

- pour $S \ll K_m$, avec $k_2 \gg k_3$ ou $k_2 \ll k_3$

$$r_m = \frac{\alpha}{K'_A} K_{A(app)} \quad (\text{Eq. 102})$$

$$K_A^* = K_{A(app)} \quad (\text{Eq. 103})$$

$$K_A^{**} = \frac{\alpha}{K'_A} \quad (\text{Eq. 104})$$

- pour le paramètre k_{cat} d'hydrolyse trypsique de l'AGEE :

$$r_m = \alpha \frac{K'_A}{K'_{A(app)}} = c \frac{1 + H/K_{AH}}{1 + H/K_H} \quad (\text{Eq. 105})$$

$$K_A^* = K'_{A(app)} \quad (\text{Eq. 106})$$

$$1/K_A^{**} = \alpha/K'_A \quad (\text{Eq. 107})$$

- pour le paramètre k_{cat} d'hydrolyse trypsique de l'AGPNE :

$$r_m = \frac{\beta K''_A}{K''_{A(app)}} = \beta \frac{1 + H/K_{AH}}{1 + H/K_H} \quad (\text{Eq. 108})$$

$$K_A^* = K''_{A(app)} \quad (\text{Eq. 109})$$

$$1/K_A^{**} = \beta/K''_A \quad (\text{Eq. 110})$$

On remarque que dans les 3 cas, le paramètre K_A^{**} est indépendant du pH, et ceci est vérifié expérimentalement pour l'AGPNE. Les paramètres expérimentaux r_m , K_A^* et K_A^{**} obtenus dans chacun de ces cas spécifiques sont donc reliés très simplement aux constantes vraies du schéma 6. On peut ainsi dans le cas du 2 aminoheptane calculer les paramètres $K_{A(app)}$, K'_A , $K''_{A(app)}$ à pH 7 et les coefficients α et β pour l'hydrolyse trypsique de l'AGEE en tenant compte du fait que le même acylenzyme est formé à partir de l'AGEE et de l'AGPNE. Les résultats de ce calcul sont donnés dans le tableau 20.

b - DISCUSSION DES RESULTATS.

L'activation de l'hydrolyse enzymatique de substrats spécifiques par des effecteurs autostériques des substrats spécifiques a déjà été signalée dans le cas de la chymotrypsine (62) mais les effets observés ici sont beaucoup plus importants. Il faut tout d'abord remarquer que les données du tableau 20 indiquent que l'affinité du 2 aminoheptane pour l'enzyme varie considérablement d'un complexe à l'autre. D'abord le 2 aminoheptane voit son affinité pour l'enzyme augmenter d'un facteur 3 environ au niveau du complexe de Michaelis par rapport à sa valeur pour l'enzyme libre. Simultanément, l'affinité du substrat (AGEE) pour l'enzyme est augmentée au niveau du complexe EA. Un tel effet incom-

TABLEAU N° 20

Paramètres cinétiques d'hydrolyse trypsique de l'AGEE à pH 7 suivant le schéma cinétique 6. Conditions 25°, CaCl₂ 0,025 M, $\mu = 0,58$. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses.

a		b	c	d	e	d
$k_3(\text{app})$	$k_2(\text{app})$	$K_A(\text{app})$	$K_A'(\text{app})$	$K_A''(\text{app})$	α	β
(sec ⁻¹)	(sec ⁻¹)	(M)	(M)	(M)		
.36	.019	.085 (.015)	.026 (.003)	.30 (.1)	11	121

- a Valeur calculées à partir du k_{cat} de l'AGPNE à pH 6,3 en prenant $\text{p}K_H'' = 6,83$
- b Valeur moyenne obtenue à partir des valeurs de $K_A(\text{app})$ de l'AGEE et de l'AGPNE à différents pH et ramenées le cas échéant à pH 7 au moyen de l'équation 88.
- c Valeurs moyennes calculées à partir des données des tableaux 16 et 17.
- d Valeur obtenue à partir des données du tableau 15 concernant l'AGPNE.

pétitif est absolument inexplicable sur la base d'un enzyme rigide, sauf s'il existe au sein du complexe ternaire ESA des interactions attractives entre le substrat et l'amine. Etant donné la structure de ces deux composés, on voit mal quelle pourrait être la nature de ces interactions^a.

Par contre au niveau de ES', l'affinité de l'amine décroît par rapport à sa valeur dans l'enzyme libre. On peut également remarquer que la diminution de l'affinité de l'amine au niveau de ES' par rapport à ES ($K_A'' > K_A'$) est presque exactement compensée par l'augmentation de l'effet activateur sur l'étape de désacylation par rapport à l'étape d'acylation ($\beta > \alpha$, et $\beta/K_A'' \approx \alpha/K_A'$)^b. La conclusion de ces résultats est que *les sites occupés par l'amine et le substrat subissent au cours des étapes catalytiques des modifications structurales importantes responsables des variations d'affinité observées et des effets activateurs plus ou moins importants : ceci implique nécessairement des changements de conformation de la protéine enzyme au niveau du centre actif.*

Pour aller plus loin dans l'interprétation de nos résultats, il est utile de considérer la figure 33 récapitulant les variations des paramètres

$$r_m = \alpha \frac{K_A'}{K_{A(app)}}, \quad K_{A(app)} \quad \text{et} \quad \frac{r_m}{K_{A(app)}} = \frac{\alpha}{K_A'} \quad \text{obtenus avec l'AGPNE à pH 4,95 pour}$$

$S < K_m$ dans les séries d'alkylamines I et II.

Il apparaît d'abord que les valeurs de $K_{A(app)}$ obtenues pour les 1-alkylamines varient sensiblement de la même façon en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée que leurs valeurs de K_I , constante d'inhibition compétitive déterminées par Heidberg (6) avec un substrat spécifique, la benzoyllysine méthylester. Le facteur moyen qui différencie nos données de celles d'Heidberg (exception faite de l'éthylamine^c) peut s'expliquer en considérant l'écart de pH (et peut-être de force ionique (40)) entre notre étude et la sienne, compte tenu du déplacement du pK de l'imidazole observé en présence d'amine et donc de la variation de $K_{A(app)}$ en fonction du pH.

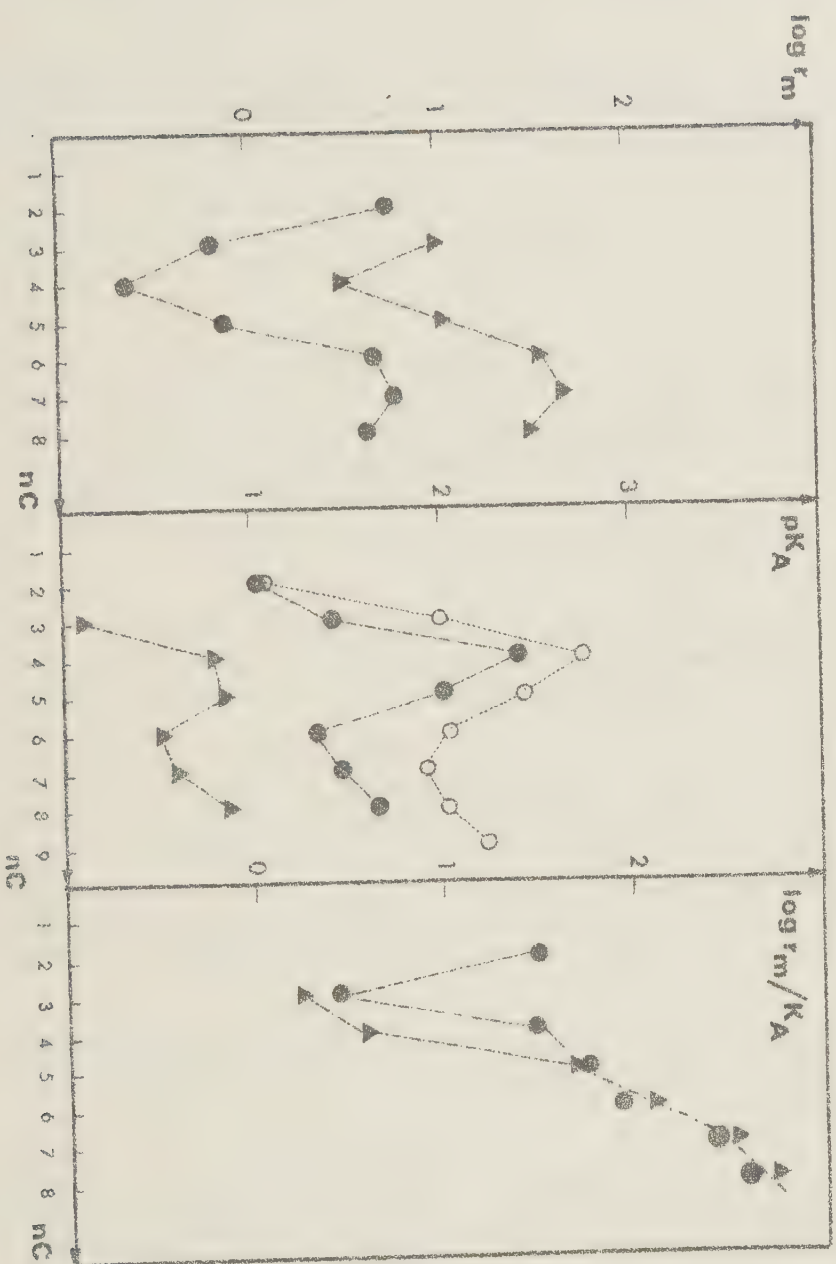
Ceci indique que *les sites de ces amines impliquées dans le phénomène d'activation de substrats neutres étudié ici est le même que celui qu'elles occupent lors de l'inhibition compétitive de substrats spécifiques.*

^a Il ne peut être question d'une "solubilisation" réciproque de l'amine et du substrat au niveau du centre actif étant donné que ces deux composés sont déjà très solubles dans l'eau.

^b Notons toutefois que la valeur de α/K_A' est environ 2 fois plus forte pour l'AGEE que pour l'AGPNE.

^c La valeur donnée par Heidberg (6) est nettement plus forte que celle rapportée par Inagami (56) qui est en meilleur accord avec la nôtre.

Figure 33 - Variation des paramètres r_m , K_A et r_m/K_A (pour $S < K_m$) de l'AGPNE en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des alkylamines 1 (●) et 2 (▲). Conditions : voir tableau 12. Les points O correspondent aux valeurs de Heidberg pour pK_I (voir texte) à pH 6,6, $\mu = 0,18$, 25° (6) pour l'inhibition compétitive d'un substrat spécifique.



On peut admettre qu'il en est de même pour la série des 2 aminoalcanes. Cette conclusion rejoint celle d'Inagami (56) en ce qui concerne les 4 premiers termes de la série I.

Au moyen d'une analyse thermodynamique détaillée de ses résultats expérimentaux, Heidberg conclut que les amines de la série I interagissent avec 2 subsites hydrophobes de l'enzyme séparés par une zone polaire. L'interaction avec le premier site correspond à l'augmentation observée du pK_I avec n lorsque $1 < n < 4$, puis le passage de l'extrémité de la chaîne hydrophobe des amines supérieures dans la zone polaire entraîne une diminution du pK_I jusqu'à $n = 7$. Ensuite l'interaction de l'amine avec le second site hydrophobe de l'enzyme augmente à nouveau les valeurs de pK_I en fonction de n pour $n > 7$.

D'après ce modèle, schématisé grossièrement dans la figure 34 a, l'activation maximale observée avec le 2 aminoheptane (ou le 1 aminoheptane) correspond justement à la présence de 3 carbones de la chaîne hydrocarbonée de l'amine dans la zone polaire s_0 séparant les deux zones hydrophobes s_1 et s_2 , ce qui doit entraîner un important remaniement du microenvironnement polaire de cette chaîne hydrocarbonée (63-64), pouvant provoquer un changement de conformation *local* de l'enzyme.

Pour $n > 8$, l'amine entrerait en interaction avec le subsite 2 de l'enzyme ce qui aurait pour effet de rigidifier le centre actif et donc de diminuer l'effet activateur comme on l'observe effectivement pour les 1 et 2 amino-octanes.

On conçoit par ailleurs que la saturation progressive du premier site hydrophobe de l'enzyme s_1 , identique à celui postulé par Shaw (65) jusqu'à $n = 4$ se traduise également par des modifications structurales du centre actif ; le minimum observé dans l'effet activateur pour $n = 4$ peut être rapproché du fait que la saturation complète de ce site par la 1 butylamine ou la 2 butylamine doit entraîner une modification minimale de ce site étant donnée sa complémentarité "naturelle" pour la chaîne cationique des substrats spécifiques (4 atomes de carbone).

L'effet activateur supérieur et l'affinité inférieure des 2 alkylamines par rapport aux 1 alkylamines peuvent provenir de la position particulière du groupement ammonium de ces premières.

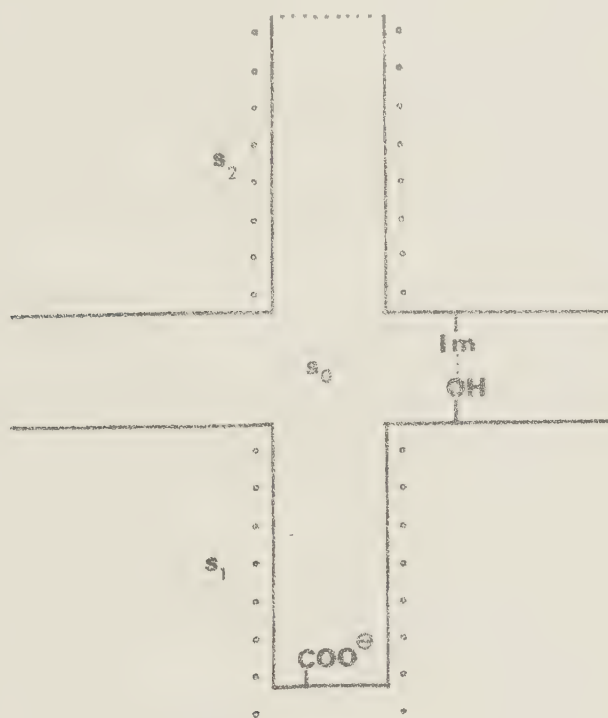
Si un groupement est en interaction avec le carboxyle du centre actif situé au fond de la crevasse hydrophobe du subsite s_1 , il est évident que la présence d'un méthyl à proximité doit perturber cette interaction par rapport aux alkylamines 1, comme l'indique le schéma de la figure 34 b. Il est donc possible que dans le cas des 2 alkylamines une distorsion supplémentaire de l'enzyme soit induite au niveau de ce sub-site 1, d'où l'affinité médiocre de ces amines et leur effet activateur accru par rapport aux 1 alkylamines, comme nous l'avons discuté dans la première partie de ce travail.

On explique ainsi la variation de l'effet activateur en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'amine dans les séries I et II et l'augmenta-

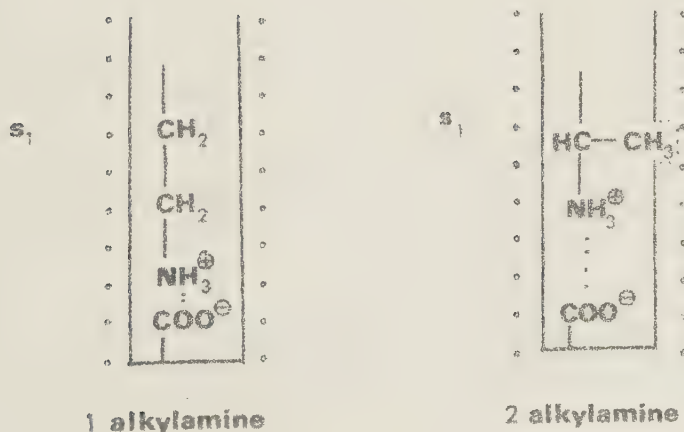
Figure 34

- a : Description schématique du centre actif de la trypsine d'après les données de Heidberg (voir texte). s_1 et s_2 sont les subsites hydrophobes, s_0 la zone polaire séparant ces deux subsites et au niveau de laquelle se situent probablement les entités catalytiques (imidazole et sérine).
- b : Interactions d'alkylamines 1 et 2 avec l'enzyme au niveau du subsite 1. Le groupement α CH_3 des 2 alkylamines perturbe l'interaction du groupement ammonium avec le carboxyle du centre actif.

a :



b :



tion importante de ces effets dans la série II par rapport à la série I.

Il est difficile de savoir comment l'enzyme effectue exactement cette distinction entre les amines des séries I et II. Notons cependant que le 3 aminohéptane a un effet activateur beaucoup plus faible que celui du 2 aminohéptane, ce phénomène est donc bien spécifique des 2 alkylamines. Un résultat assez curieux est cependant la similitude des valeurs de α/K_A' ($= r_m/K_{A(app)}$) dans les séries I et II pour $n > 4$. Tout se passe comme si la fixation du substrat sur EA supprimait la distinction de l'enzyme entre les séries I et II, par suite d'effets de compensation diminuant K_A' par rapport à K_A ou augmentant la valeur de α de ces 2 alkylamines en comparaison de celle des amines de la série I. Ces effets de compensations variés se retrouvent fréquemment dans la catalyse trypsique (voir chapitre 2 et tableau 20 de ce chapitre), ils proviennent probablement d'une série complexe d'actions réciproques enzyme-substrat-activateur dans le cas présent.

A ce point de notre discussion, on peut se demander s'il y a quelque rapport entre les changements de conformation invoqués ici et ceux mis en jeu dans le cas des substrats spécifiques.

Le fait que les 2 aminoalcanes soient de meilleurs activateurs que les 1 aminoalcanes et que l'amine la plus autostérique des substrats spécifiques c'est à dire la 1 butylamine se révèle le moins bon activateur des 2 séries testées indique en tout cas qu' *il n'y a pas de complémentarité étroite entre l'amine et le substrat aspécifique* et que la première n'agit pas exactement comme un effecteur autostérique des substrats spécifiques ^a.

Hein (66) en étudiant l'inhibition de l'hydrolyse trypsique de substrats non spécifiques conclut que les substrats *neutres* ne sont pas fixés au même niveau du centre actif de l'enzyme que les substrats *chargés*. Il est possible par exemple qu'ils soient adsorbés au niveau du subsite s_2 mis en évidence par Hsidge. Quoi qu'il en soit, ces résultats indiquent bien qu'il ne faut pas s'attendre à une complémentarité étroite entre l'amine et le substrat aspécifique et c'est à ce sens que les conclusions d'Inagami nous semblent erronées. *Ainsi le changement de conformation requis pour activer l'hydrolyse des substrats aspécifiques peut très bien différer de celui mis en jeu dans le cas des substrats spécifiques.*

La diminution du pK de l'imidazole induite par l'éthylamine et le 2 aminohéptane au niveau de l'enzyme libre peut impliquer aussi l'idée d'un changement de conformation de l'enzyme entraînant une variation du microenvironnement de l'histidine du centre actif. Ce résultat doit être rapproché de ceux obtenus avec la chymotrypsine (67), mais il peut également être interprété sur la base d'un enzyme rigide en considérant la moins bonne fixation des amines de la série II sur l'enzyme par rapport à celles de la série I. On peut en effet expliquer cette diminution du pK

^a Il serait intéressant de connaître les paramètres cinétiques d'un éventuel substrat comme l'ester éthylique de l'acide L 2 acetamido 5 aminocaproïque.

de l'imidazole en admettant une répulsion électrostatique entre le groupement ammonium chargé de l'amine et l'ion imidazolium. Comme dans le cas des 2 aminoalcanes, la présence d'un groupement méthyl peut perturber l'interaction du groupement ammonium avec le carboxyle du centre actif (voir figure 34 b), il est possible que cette diminution plus importante du pK de l'imidazole avec la 2 heptylamine par rapport à l'éthylamine soit due à un rapprochement du groupement cationique de cette première et de l'ion imidazolium par suite de la gêne stérique provoquée par le groupement méthyl au niveau de son interaction avec le carboxyle du site s_1 .

Quoiqu'il en soit, le déplacement du pK de l'imidazole semble relié à l'importance de l'effet activateur, qui met certainement en jeu un changement de conformation.

L'effet des amines sur l'hydrolyse trypsique du BGEE et du pNPA vient renforcer l'idée d'un changement de conformation de l'enzyme. D'abord l'inhibition partielle observée avec le BGEE est à rapprocher de la diminution importante de K_m accompagnant le remplacement du groupement acetyl par un benzoyl lorsqu'on passe de l'AGEE à la BGEE. Cette diminution de K_m ($=K_s$ dans ce cas) traduit une augmentation des interactions de l'enzyme avec le substrat et donc une certaine rigidification de la conformation de S au sein de ES. Il est d'ailleurs possible qu'il y ait dans ce cas des fixations non productives, étant donné que k_{cat} n'augmente que d'un facteur 2 environ par rapport à celui de l'AGEE. Il est donc probable que dans le cas de ce substrat le changement de conformation induit par l'amine ne puisse modifier l'orientation du substrat dans un sens favorable à la catalyse, étant donnée la rigidité relative de sa conformation initiale.

Dans le cas du paranitrophenylacetate, *au contraire* le changement de conformation induit par l'amine ne serait pas suffisant pour permettre une réorientation correcte des entités catalytiques par rapport au substrat, ce dernier ne possédant pas le groupe fonctionnel (liaison α peptidique) au niveau duquel pourrait s'opérer sa propre réorientation, ce qui suppose d'ailleurs que la *réorientation du substrat* par l'intermédiaire de groupes de contact de l'enzyme soit prédominante dans l'effet d'activation plutôt qu'une *simple réorientation des entités catalytiques* indépendamment du substrat. L'importance des effets d'orientation dans les phénomènes d'activation étudiés ici est suggérée par les données d'Inagami (40) qui montrent que *l'effet activateur est un effet purement entropique* dans le cas des amines à courte chaîne.

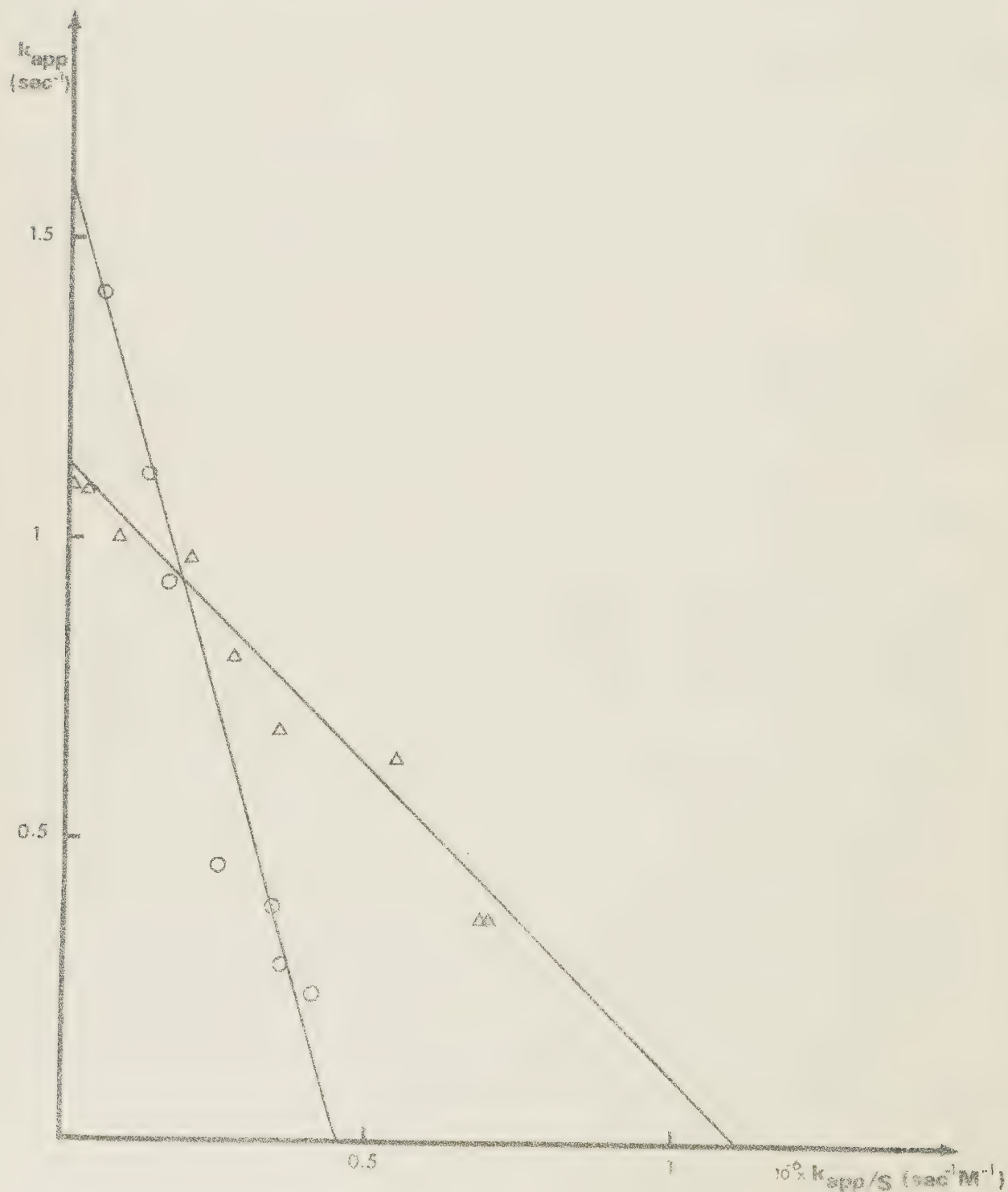
Dans le cas du pNPA il reste le fait que la valeur de K_A trouvée pour le 2 aminoheptane soit considérablement plus élevée que celle obtenue avec les autres substrats testés (AGEE, AGPNE, BGEE). Ceci est à rapprocher des résultats obtenus en étudiant l'effet de cette amine sur l'hydrolyse de substrats spécifiques comme le BAEE ou la CLPNE qui n'est pas simplement une inhibition compétitive.

A pH 5.0, on observe une augmentation sensible de k_{cat} parallèlement à une augmentation du K_m , l'effet étant du même ordre pour les 2 substrats testés (figure 35).

Fig. 1a. Effet de l'7-aminoheptane sur l'hydrolyse trypsique de la CBRL.
 Type 5,00, 2% protéine 0,035 M, CaCl_2 0,58 mM, NaCl 0,925 M, 25°. La vi-
 tesse d'hydrolyse du para-nitrobenzyl-L-glutamate est mesurée au moyen de
 la méthode spectrophotométrique à 320 m μ .

○ 7-aminoheptane 0,25 M

△ sans amine.



A pH 6.3, la variation du K_m pour le BAEE en présence de 2 aminoheptane peut être mise sous la forme :

$$K_m = K_{mo} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \left(1 + \frac{I}{K_I'} \right) \quad (111)$$

avec $K_I \sim 0.1$ M et $K_I' \sim 0.5$ M, indiquant l'existence d'au moins deux sites de fixation de l'amine au niveau de l'enzyme libre (figure 36). Comme l'augmentation de k_{cat} est plus faible qu'à pH 5, il est possible qu'il y ait un déplacement du pK de l'imidazole vers les pH acides au niveau de ES' en présence de 2 aminoheptane. Dans les mêmes conditions l'effet du 1 aminoheptane est purement compétitif (figure 36), la valeur de $K_I = 0.013$ M étant en bon accord avec celle donnée par Heidberg, dans des conditions voisines (63).

Cet effet complexe du 2 aminoheptane révèle probablement l'existence de fixations non spécifiques de cette amine sur l'enzyme comme J.J. Béchet (15) l'avait déjà observé avec la benzylamine aux fortes concentrations. Ces résultats indiquent cependant pour la fixation spécifique une valeur de K_I voisine de celle trouvée pour K_A avec les substrats neutres. Il ne faut pas oublier que les amines à longue chaîne sont de véritables détergents et que ceux-ci peuvent se fixer sur les protéines (68).

Il est cependant curieux que cette fixation aspécifique se traduise par une activation de l'hydrolyse du paranitrophenylacétate ou du BAEE, mais des effets analogues avaient déjà été observés par Hummel (69).

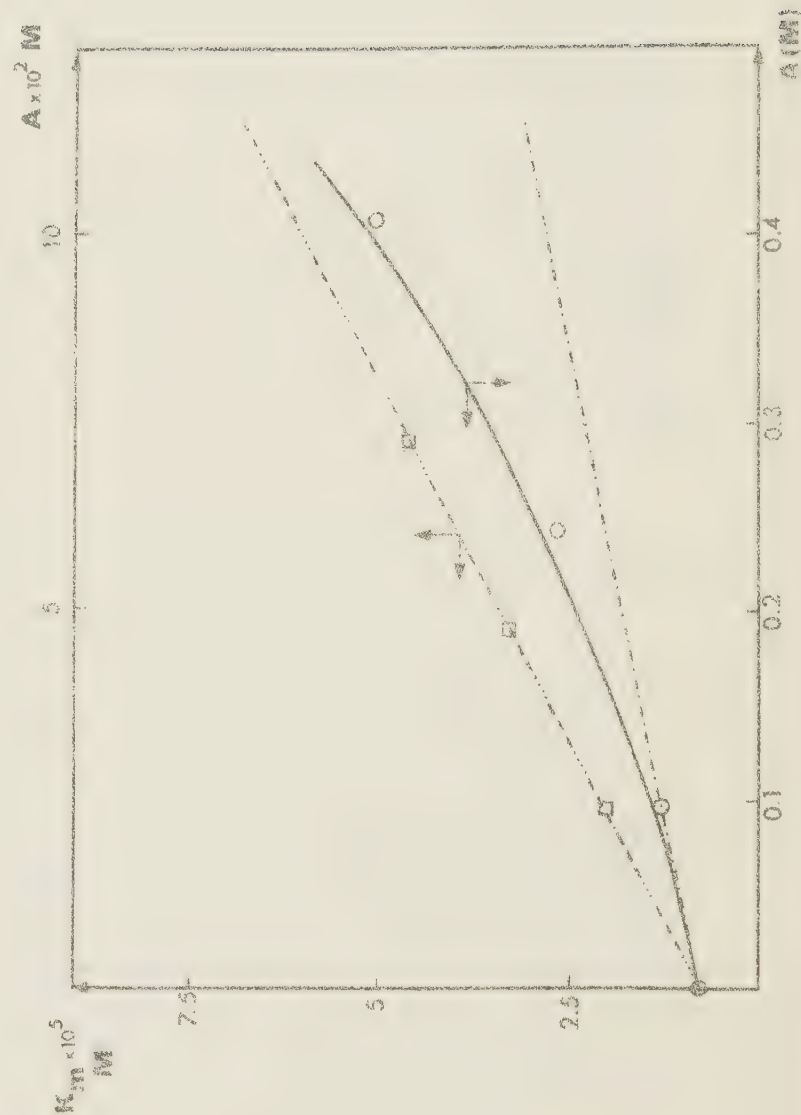
Par ailleurs, avec l'AGPNE à pH 6.4, nous avons observé aux fortes concentrations de 2 aminoheptane (> 0.4 M) une diminution de la vitesse d'hydrolyse qui pourrait être expliquée de la même façon ; Inagami (56) a observé le même phénomène avec la 1 propylamine agissant sur l'AGEE à pH 6.6.

En conclusion de cette étude, il apparaît que les phénomènes d'activation par les amines ne sont pas interprétables sur la base d'un enzyme rigide et qu'ils mettent donc en jeu des changements de conformation. L'interprétation avancée par Inagami n'est pas satisfaisante dans la mesure où elle suppose une complémentarité étroite entre l'amine et le substrat aspécifique qui ne permet pas d'expliquer l'ensemble de nos résultats, mais l'idée essentielle d'un changement de conformation induit par l'amine demeure et c'est justement lorsque la flexibilité de l'enzyme intervient dans un phénomène qu'il devient difficile à expliquer complètement, cette flexibilité étant par essence même difficile à évaluer à partir d'une investigation cinétique.

Figure 36 - Effet du 2 aminooheptane (O) et du 1 aminooheptane (□) sur le paramètre K_m d'hydrolyse tryptique de L-Ala. L'évaluation au moyen de la représentation de Michaelis intégrée. La courbe en trait plein est calculée à partir de l'équation (11) avec $K_i = 0,43$ M et $K_j = 0,5$ M. Le double en pointillés inférieure correspond à une inhibition compétitive avec $K_i = 0,013$ M. La double en pointillés supérieure correspond à une inhibition compétitive avec $K_i = 0,013$ M.

Dans le cas du 2 aminooheptane, l'est donc linéairement avec A (augmentation de l'ordre de 50 % pour $A = 0,4$ M). Dans le cas du 1 aminooheptane, sont par conséquent aux environs expérimentales près (15 %) ; l'inhibition est donc caractéristiquement compétitive.

Conditions : pH 8,3 ; Tp. 30°C 0,032 M, $\mu = 0,13$ (NaCl). CoCl_2 0,025 M, 25%.



BIBLIOGRAPHIE

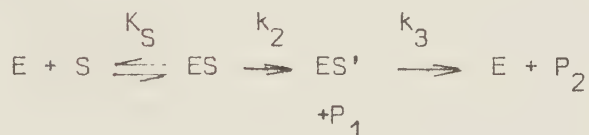
1. D.W. Ingles, J.R. Knowles ; *Biochem. J.*, 104 (1967) 369.
2. T. Inagami, T. Mitsuda ; *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1388.
3. L. Faller, J.M. Sturtevant ; *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4825.
4. H. Werbin, A. Palm, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1382.
5. M. Bergmann, L. Zerwas, J.P. Greenstein ; *Chem. Ber.*, 65 (1932) 1692.
6. J. Heidberg, E. Holler, H. Hartmann ; *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 71 (1967) 19.
7. A. d'Albis ; *Compt. Rend. Ac. Sc. Paris*, 259 (1964) 1819.
8. T. Chase, E. Shaw ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 29 (1967) 508.
9. M.L. Bender, M.L. Begue-Canton, R.L. Blakeley, L.J. Brubacher, J. Feder, C.R. Gunter, F.J. Kezdy, J.V. Killheffer, T.H. Marshall, C.G. Miller, R.W. Roeske, J.K. Stoops ; *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 5890.
10. D.D. Schroeder, E. Shaw ; *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 2943.
11. J.F. Hruska, J.H. Law, F.J. Kezdy ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36 (1969) 272.
12. T. Chase, Jr, E. Shaw ; *Biochemistry*, 8 (1969) 2212.
13. F. Seydoux ; Thèse de 3e cycle, Orsay, 1966 , p. 22
14. F. Seydoux, J. Yon ; *European J. Biochem.*, 3 (1967) 42.
15. J.J. Béchet ; Thèse, Orsay, 1968.
16. G. Ackerlof ; *J. Am. Chem. Soc.*, 54 (1932) 4125.
17. F. Seydoux, J. Yon, G. Nemethy ; *Biochim. Biophys. Acta*, 171 (1969) 145.
18. F. Seydoux ; *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 544.
19. A.N. Glazer ; *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1135.
20. N. Kobamoto, G. Löfroth, P. Camp, G. Van Amburg, L. Angenstein ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 24 (1966) 623.
21. E.F. Curragh, D.T. Elmore ; *J. Chem. Soc.*, (1962) 2948.
22. N.J. Baines, J.B. Baird, D.T. Elmore ; *Biochem. J.*, 90 (1964) 470.
23. J.J. Béchet, J. Yon ; *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 117.
24. A. Dupaix ; Thèse de 3e cycle, 1969, Orsay.
25. D.T. Elmore, J.J. Smyth ; *Biochem. J.*, 107 (1966) 97.
26. J. Chevallier, J. Yon, G. Spotorno, J. Labouesse, *European J. Biochem.*, 5 (1968) 480.
27. D.W. Ingles, J.R. Knowles, J.A. Tomlinson ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23 (1966) 745.

28. F. Seydoux, Thèse de 3e cycle, Orsay, 1966, p. 36.
29. H.C. Brown, K.A. Keblys ; J. Org. Chem., 31 (1966) 485.
30. G.G. Hammes ; Nature, 204 (1964) 342.
31. S.A. Bernhard, H. Gutfreund ; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 53 (1965) 1238.
32. S.A. Bernhard, The structure and function of enzymes, W.A. Benjamin Inc., New York, 1968.
33. W.P. Jencks, dans "Current aspects of Biochemical Energetics", édité par N.U. Kaplan et E.P. Kennedy, Academic Press, New York, 1966, p. 273.
34. E. Charney, S.A. Bernhard ; J. Am. Chem. Soc., 89 (1967) 2726.
35. D. Levine, T.W. Reid, I.B. Wilson ; Biochemistry, 8 (1969) 2374.
36. M.L. Bender, F.J. Kezdy ; J. Am. Chem. Soc., 87 (1965) 4954.
37. J.P. Greenstein, M. Winitz ; Chemistry of the amino acids ; J. Wiley and Sons Inc., Vol. 1, 1961.
38. S.G. Waley, J. Watson ; Biochem. J., 57 (1954) 529.
39. H.R. Almond, C. Niemann ; Biochemistry, 1 (1962) 12.
40. T. Inagami, S.S. York ; Biochemistry, 7 (1968) 4045.
41. J.J. Béchet, A. d'Albis ; Biochim. Biophys. Acta, 178 (1969) 561.
42. E.J. East, C.G. Trowbridge ; Arch. Biochem. Biophys., 125 (1968) 334.
43. J.A. Stewart, J.E. Dobson ; Biochemistry, 4 (1966) 1086.
44. J. Chevallier, J. Yon ; Biochim. Biophys. Acta, 122 (1966) 116.
45. B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen ; Arch. Biochem. Biophys., 95 (1961) 271.
46. G. Johannin ; Thèse de 3e cycle, Orsay, 1967.
47. J.J. Béchet, J. Chevallier, J. Labouesse, B. Arnould, S. Aldin Cicarelli, J. Yon ; Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 165.
48. R.W. Taft, dans "Steric effects in organic chemistry", édité par Newman, J. Wiley and Sons Inc., New York, 1956.
49. M. Gorecki, Y. Shalitin ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 29 (1967) 189.
50. S.S. Wang, F.H. Carpenter ; J. Biol. Chem., 243 (1968) 3702.
51. M.N. Nachlas, R.F. Plapinger, A.M. Seligman ; Arch. Biochem. Biophys., 108 (1964) 266.
52. Y. Jacquot Armand, G. Krebs ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 36 (1969) 815.
53. S.G. Waley, J. Watson ; Biochem. J., 55 (1953) 328.

54. D.T. Elmore, D.V. Roberts, J.J. Smyth ; Biochem. J., 102 (1967) 728.
55. Goldenberg H., Goldenberg V., Arch. Biochem. Biophys., 29 (1950) 154.
56. T. Inagami, T. Murachi ; J. Biol. Chem., 239 (1964) 1395.
57. D.E. Koshland, K.E. Neet ; Ann. Rev. Biochem., 37 (1968) 359.
58. B.F. Erlanger, H. Castleman ; Biochim. Biophys. Acta, 85 (1964) 507.
59. M.L. Bender, F.J. Kezdy ; J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 5330.
60. P.W. Inward, W.P. Jencks, J. Biol. Chem., 240 (1965) 1986.
61. T. Inagami, J. Biol. Chem., 239 (1964) 787.
62. R.J. Foster ; J. Biol. Chem., 236 (1961) 2461.
63. G. Nemethy ; Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 6 (1967) 195.
64. G. Nemethy, H.A. Scheraga ; J. Chem. Phys., 36 (1962) 3401.
65. M. Mares Guia, E. Shaw ; J. Biol. Chem., 240 (1965) 1579.
M. Mares Guia, E. Shaw, W. Cohen ; J. Biol. Chem., 242 (1967) 5777.
66. B.M. Sanborn, G.E. Hein ; Biochemistry, 7 (1968) 3616.
67. D.M. Glick ; Biochemistry, 7 (1968) 3391.
68. H. Polet, J. Steinhardt ; Biochemistry, 7 (1968) 1348.
J. Reynolds, S. Herbert, J. Steinhardt ; Biochemistry, 7 (1968) 1357.
69. B.C.W. Hummel ; Can. J. Biochem. Physiol., 39 (1961) 1193.

C O N C L U S I O N

Ce travail est une tentative d'interprétation de la spécificité cinétique de la catalyse trypsique sur la base du schéma réactionnel I mettant en jeu un acylenzyme :



Il est probable que ce schéma cinétique ne constitue qu'une description grossière de la catalyse trypsique : les termes de complexe de Michaelis et d'acylenzyme englobent certainement toute une série d'intermédiaires plus ou moins stables : l'investigation cinétique à l'état stationnaire ne permet de caractériser que les espèces les plus stables .

Partant des substrats spécifiques synthétiques dont les caractéristiques cinétiques sont maintenant bien établies, nous avons cherché à savoir quelles étaient les répercussions cinétiques de modifications structurales de ces substrats typiques. .

Il a été possible en outre de comparer les propriétés fonctionnelles des deux types de complexes et de montrer qu'elles pouvaient différer de façon importante. La distinction entre le complexe de Michaelis et l'acylenzyme ne porte pas uniquement sur la nature des interactions entre l'enzyme et le substrat, mais également sur les propriétés fonctionnelles de ces derniers au sein de ces deux complexes.

T A B L E A U N° 21

Paramètres cinétiques d'hydrolyse trypsique de substrats spécifiques et non spécifiques sur la base du schéma cinétique 1, au pH optimum, 25°, CaCl_2 0,025 M.

Substrat	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_2 (sec^{-1})	k_3 (sec^{-1})	K_s (mM)
L BAEE	23.15	.0026	8900000	21000	23.15	2.40
D BAEE	.091	.74	123	.3	.15	2.50
L ATEE ^a	22.25	29.00	770	22.25		29.00
L TME b	.68 3.95	177.00	3.9	.68 3.95		177.00
L LME b	6.70 51.00	.27	24300	335 ^d 51	6.7	14.00 ^d
L LPA	.0031	.51	6.1	.003	6.7	.51
L TOME ^c	5.37	15.80	340	5.4		15.80
AGEE ^c e	.019 .21	880.00 270.00	.022 .80	.019 .21	.36 ^f 43.5 ^f	880.00 270.00

a N. Kellersohn, communication personnelle.

b Forme α ammonium du substrat précédent

c à pH 7,0.

d valeurs évaluées à partir de la constante d'inhibition de l'hydrolyse trypsique de l'APAME par la L-lysine amide.

e paramètres cinétiques de l'hydrolyse trypsique de l'AGEE dans le complexe ternaire enzyme-substrat-2 aminocaptane à pH 7,0.

f valeurs obtenues à partir de l'AGPNE.

Dans ce travail, nous avons successivement étudié :

- a - La compétition nucléophile dans les réactions d'hydrolyse trypsique sur la base du schéma (4) en vue de préciser l'étape limitante pour les substrats spécifiques et non spécifiques (chapitre II).
- b - L'effet du pH sur l'hydrolyse de substrats non protégés sur leur groupement α aminés (chapitre III), dans le but de déterminer la fonction de la liaison peptidique de la plupart des substrats dans la spécificité trypsique.
- c - L'effet des alkylamines sur l'hydrolyse de substrats neutres comme l'AGEE afin d'établir le rôle de la chaîne cationique des substrats spécifiques.

La plupart des résultats obtenus dans ce travail montrent que, pour un substrat donné, spécifique ou aspécifique, les propriétés cinétiques fonctionnelles des complexes intermédiaires ES et ES' diffèrent très nettement, que ce soit par leur vitesse respective de transformation (acylation et désacylation) (voir chapitre II), par la variation du pK de l'imidazole du centre actif par rapport à l'enzyme libre (voir chapitre III) ou par leur affinité variable pour des alkyl-amines dans le cas de l'hydrolyse d'un substrat neutre (voir chapitre IV), ainsi que par l'importance du phénomène d'activation qui résulte dans ce cas de la formation du complexe ternaire enzyme-substrat-amine.

L'analyse de la compétition nucléophile eau-alcool dans les réactions d'hydrolyse trypsique a permis d'établir que l'étape d'acylation était limitante pour les esters non spécifiques à la différence des esters spécifiques caractérisés par une étape de désacylation limitante. Ce point apparaît clairement dans le tableau 21 qui récapitule l'ensemble des valeurs des paramètres cinétiques du schéma 1 déterminées dans ce travail pour des substrats spécifiques ou aspécifiques.

La stéréospécificité de la trypsine s'exerce au niveau des étapes d'acylation et de désacylation (stéréospécificité cinétique) mais l'étape d'acylation est beaucoup plus affectée que l'étape de désacylation lorsqu'on passe de la forme L à la forme D du BAEE.

Cette dissymétrie dans l'expression de la spécificité de la trypsine au niveau des deux étapes catalytiques du schéma 1 reflète probablement l'interven-

tion d'un facteur spécifiquement enzymatique au cours de l'étape d'acylation^a des substrats spécifiques. Il peut s'agir soit d'une distorsion du substrat favorable à la catalyse et induite par l'enzyme au niveau de la liaison ester labile, soit d'un changement de conformation de l'enzyme couplé à l'acylation de la sérine du centre actif.

Dans le cas du L BAEE on observe une stabilisation importante de l'acylenzyme formé par rapport au complexe de Michaelis et qui n'apparaît plus dans le cas du dérivé D. Sur le plan énergétique, cette stabilisation de l'acylenzyme formé rend compte de la différence importante des vitesses d'acylation et de désacylation caractérisant les substrats spécifiques. Il apparaît donc que la spécificité de la trypsine s'exerce principalement au niveau de l'étape d'acylation et qu'il s'agit donc d'une spécificité cinétique.

L'analyse cinétique de l'hydrolyse trypsique de dérivés d'acides aminés non substitués sur leur groupement α aminé nous a permis d'expliquer les profils d'activité en fonction du pH très particuliers de ces substrats. D'abord la forme α ammonium de ces substrats est hydrolysée 6 à 8 fois plus rapidement que la forme α aminée, sans doute en raison de l'effet inductif du groupement α ammonium. La valeur du pK de l'imidazole du centre actif varie considérablement suivant le substrat et le type de complexe considéré. Il existe une interaction électrostatique répulsive entre le groupement α ammonium du substrat et l'ion imidazolium responsable de la valeur anormalement basse du pK de l'imidazole observée avec la LME pour l'acylenzyme.

Il apparaît que la diminution de ce pK par rapport à sa valeur dans l'enzyme libre est beaucoup plus faible au niveau du complexe de Michaelis que de l'acylenzyme, ce qui suggère une réorientation du substrat d'une étape à l'autre du mécanisme réactionnel par le biais d'un changement de conformation de l'enzyme.

La liaison α peptidique des substrats spécifiques favorise la catalyse enzymatique essentiellement au niveau de l'étape d'acylation, ce qui va dans le sens des résultats précédents : l'élimination d'un motif structural essentiel des substrats spécifiques se traduit par une diminution beaucoup plus considérable de la vitesse d'acylation de l'enzyme que de sa vitesse de désacylation. Il

^a Les termes d'étape d'acylation et de désacylation englobent certainement toute une série d'étapes élémentaires plus ou moins discrètes qui ne peuvent être résolues par l'investigation cinétique à l'état stationnaire.

apparaît donc que l'orientation du substrat dans le complexe de Michaelis est un facteur essentiel de la spécificité de la catalyse trypsique.

Le groupement αNH_2 de ces substrats peut en outre agir comme entité nucléophile vis-à-vis de l'acylenzyme et permettre ainsi des réactions de transpeptidation dont les conséquences cinétiques semblent être beaucoup plus importantes dans le cas du LPA caractérisé par une étape d'acylation limitante que dans le cas de la LME pour laquelle l'étape de désacylation est limitante. Il nous semble vraisemblable de mettre en cause dans ce phénomène le site hydrophobe récepteur des alcools à longue chaîne qui pourrait être spécifique de la chaîne hydrocarbonée en C_4 de la lysine impliquée dans cette transpeptidation. L'effet d'activation par le substrat observé avec le LPA peut être relié à ces transpeptidations sans qu'il soit à l'heure actuelle possible d'en donner le mécanisme exact.

L'effet activateur des alkylamines sur l'hydrolyse des esters dérivés de l'acétylglycine ne peut être expliqué sur la base d'un enzyme rigide. L'affinité des amines pour leur site récepteur de l'enzyme, identique à celui qui est responsable de l'inhibition compétitive de l'hydrolyse de substrats spécifiques, varie considérablement suivant l'état de l'enzyme et ce résultat semble indiquer des modifications importantes de la géométrie du centre actif au cours des étapes de la catalyse. Le fait que les 2 alkylamines soient de meilleurs activateurs que les 1 alkylamines mais que cette activation plus importante soit compensée assez exactement par une diminution de leur affinité pour l'enzyme libre par rapport aux 1 alkylamines indique qu'une partie de l'énergie de fixation potentielle de l'amine est utilisée à induire un changement de conformation de l'enzyme favorisant la catalyse ou la fixation du substrat. La même conclusion peut être tirée de la corrélation très étroite observée entre l'affinité du 2 aminoheptane et l'effet activateur correspondant pour les deux complexes du mécanisme catalytique.

Les 2 aminoalcanes étant moins spécifiques que les 1 aminoalcanes en termes d'autostéricité, il est probable que le changement de conformation requis pour l'activation de l'hydrolyse de ces substrats diffère assez nettement de celui des substrats spécifiques, sans doute parce que la fixation des substrats neutres ne se fait pas exactement au même niveau que celui des substrats cationiques. Le fait que l'effet activateur notable de ces amines n'est observé qu'avec les dérivés

de l'acétylglycine indique également une certaine précision dans le changement de conformation induit par les amines au niveau de l'enzyme et que les conséquences de ce changement de conformation consistent plutôt en une modification de l'orientation du substrat par rapport aux groupes catalytiques qu'en une réorientation de ces derniers par rapport au substrat.

Les résultats de l'ensemble de ces études suggèrent donc une certaine flexibilité de l'enzyme et du substrat au cours des étapes de leurs transformations chimiques décrites par le schéma cinétique 1 : les changements de conformation jouent certainement un rôle important dans la spécificité de la catalyse tryptique, probablement à la suite d'une série d'actions réciproques complexes entre l'enzyme et le substrat.

Mais si les études cinétiques à l'état stationnaire peuvent permettre de mettre en évidence indirectement de tels changements de conformation, elles ne permettent pas d'en définir les modalités et leur rôle exact. A ce sens, elles constituent une plateforme de départ pour des méthodes d'investigation plus fines. Les résultats obtenus dans ce travail devraient maintenant être détaillés en utilisant d'abord des techniques rapides (stopped flow et T jump) puis, pour aller plus loin dans la description de ces changements de conformation et de leur rôle au niveau du substrat, il serait nécessaire d'avoir recours à des méthodes d'investigation structurales fines comme la RMN qui permettraient d'étudier un point précis de la protéine enzyme et du substrat d'un point de vue dynamique, l'efficacité et la spécificité de la catalyse enzymatique ne pouvant être ramenées uniquement à une série d'actions statiques.

T A B L E D E S M A T I E R E S

PREMIERE PARTIE : Interprétation de l'efficacité et de la spécificité de la catalyse enzymatique.

- Les modèles enzymatiques.
- Concepts physico-chimiques.
 - a) Facteurs de proximité
 - b) Effets de solvant et de micro-environnement
 - c) Catalyse acide base, intermédiaires covalents
 - d) Effets d'orientation du substrat
 - e) Distorsion du substrat dans le complexe ES (Rack ou Strain).
- Rôle de la conformation de l'enzyme dans la catalyse.
 - a) L'ajustement induit de Koshland
 - b) Actions réciproques enzyme-substrat.
- Les résultats de l'analyse cristallographique des protéines enzymes.
- Le cas de la trypsine.
- Bibliographie.

DEUXIEME PARTIE : Analyse cinétique des réactions enzymatiques et analyse statistique des données expérimentales.

Chapitre I - Etats préstationnaire et stationnaire. Quasi-équilibre.

1. Etat préstationnaire et état stationnaire.
2. Approximation de l'état stationnaire.
3. Approximation du quasi-équilibre.

Chapitre II - Analyse statistique des données cinétiques. Programmation.

- . Principe de la méthode itérative
- . Analyse d'une régression multilinéaire par la méthode des moindres carrés.
- . Analyse des variances.
- . Exemple d'application.
- . Programmation d'un calcul itératif : description du programme PS3.

Bibliographie.

TROISIEME PARTIE : Résultats expérimentaux.

Chapitre I - Matériel et méthodes.

I. Substrats, effecteurs et enzymes.

- a) Substrats et effecteurs
- b) Enzymes.

- 1) Purification de la trypsine
- 2) Titration du centre actif.

II. Méthodes d'investigation cinétiques.

- a) Méthodes potentiométriques.
- b) Méthode spectrophotométrique.

Chapitre II - Compétition nucléophile et étape limitante pour des substrats spécifiques et non spécifiques.

I. Rappel du principe de la méthode.

II. Résultats de la compétition nucléophile avec des substrats spécifiques et non spécifiques.

III. Influence de la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'alcool sur sa réactivité apparente.

IV. Discussion des résultats de la compétition nucléophile.

Chapitre III - Analyse cinétique de l'hydrolyse tryptique des dérivés de la lysine non protégés sur leur groupement α aminé.

- a) Résultats expérimentaux avec la LME.
- b) Analyse des données cinétiques.
- c) Résultats avec la TME.
- d) Données avec la lysine paranitroanilide.
- e) Discussion de l'effet du pH sur l'hydrolyse de la LME, de la TME et du LPA.
- f) Signification du phénomène d'activation par le substrat observé avec le LPA.

Chapitre IV - Effet des amines sur l'hydrolyse trypsique de substrats neutres.

I. Résultats expérimentaux.

- a) Effet d'une série d'alkylamines sur l'hydrolyse trypsique de l'AGPNE pour $S < K_m$.
- b) Déplacement par les amines du pK de l'imidazole du centre actif dans l'enzyme libre.
- c) Effets des amines sur les paramètres k_{cat} et K_m de l'AGPNE.
- d) Effets des amines sur l'hydrolyse trypsique de l'AGEE.
- e) Résultats obtenus avec le paranitrophényl acétate et la benzoyl glycine éthylester.
 - 1) paranitrophényl acétate.
 - 2) benzoyl glycine éthylester.

II. Interprétation cinétique et discussion des résultats expérimentaux.

- a) Schéma cinétique.
- b) Discussion des résultats.

Bibliographie.

Conclusion.

